DER BROMTHALEIN-LEBERFUNKTIONSTEST ZUR ERKENNUNG DER FETTLEBER BEIM HUHN

PETER HOCKE

1972

Aus dem Institut für Krankheiten des Haus- und Wildgeflügels
der Ludwig Maximilians-Universität München

Vorstand: Professor Dr. I. Gylstorff

DER BROMTHALEIN - LEBERFUNKTIONSTEST ZUR ERKENNUNG DER FETTLEBER BEIM HUHN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig Maximilians-Universität München

von

Peter Hocke

aus Oberschleißheim

München 1972

Gedruckt mit Genehmigung der tierärztlichen Fakultät

der Universität München

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. J. Boessneck

Referent: Prof. Dr. I. Gylstorff

Korreferent: Prof. Dr. J. v. Sandersleben

Tag der Promotion: 11.2.1972

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
LITERATUR	3
DER BROMTHALEINTEST	15
DER BROMTHALEINTEST ALS MIKROMETHODE	18
MATERIAL	20
METHODIK	20
DURCHFÜHRUNG DER BSP-MIKROMETHODE	21
HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG	23
QUANTITATIVE GESAMTFETTBESTIMMUNG	24
STATISTISCHE ABSICHERUNG DER RESULTATE	27
BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	28
DISKUSSION DER ERGEBNISSE	44
ZUSAMMENFASSUNG	49
SUMMARY	50
LITERATURVERZEICHNIS	51

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

		Seite
Abbildungen 1 - 3	Verlaufskurve der Bromthalein-Gesamtclearance	36/37
Tabellen 1 - 2	Ergebnisse der Bromthalein-Extinktionswerte	38/39
Tabellen 3 - 4	Mittelwerte und Standardabweichungen der untersuchten Größen	40/41
Tabellen 5 - 6	Plasmakonzentration (In) bei 3 Minuten, durchschnittliche Eliminationskonstante k, das Bestimmtheitsmaß R^2 bei 3 beziehungsweise 4 gewählten Zeitpunkten	42/43
Tabelle 7	Fraktionale Clearance k	37

Einleitung

Das Vorkommen einer Fettleber und deren Folgen beim Huhn werden bereits in älteren Lehrbüchern über Geflügelkrankheiten erwähnt. Als Ursachen einer nicht toxisch bedingten fettigen Leberentartung werden eine zu geringe Bewegung bei zu reichlicher Fütterung, Stoffwechselschäden und Futterschäden angesehen (van HEELSBERGEN,1929; REINHARDT,1950).

Seitdem COUCH (1956) dieses Krankheitsbild erneut als ein ernsthaftes Problem der Geflügelintensivhaltung erkannt hat, sind darüber zahlreiche Arbeiten veröffentlicht worden. Eine zusammenfassende Übersicht der vorwiegend nordamerikanischen Literatur über das Fettlebersyndrom (FLS) geben BARTON (1967) und WRIGHT (1969).

Unter dem Symptomenkomplex "Fettlebersyndrom" der Legehenne wird eine unphysiologische hochgradige Verfettung der Leber verstanden, welche meistens mit einer übermäßigen subkutanen und abdominalen Fettansammlung einhergeht. Das Ovar ist bei Beginn dieser Erkrankung noch in Funktion. Das klinische Bild einer am Fettlebersyndrom erkrankten Legehennenherde ist recht symptomarm. Am aufschlußreichsten ist der deutliche Rückgang der Legeleistung bis zu 30 % innerhalb kurzer Zeit bei einer sonst gesunden Herde. Betroffen werden die Tiere bei Legebeginn und besonders während der Hochleistungsperiode. Die eigentliche Morbidität ist nicht feststellbar, Selbstheilung erfolgt häufig. Die Mortalität schwankt um monatlich 5 %. Der wirtschaftliche Verlust ist vorwiegend durch den Leistungsabfall bedingt.

Bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung fällt die vergrößerte, gelblich-verfärbte, verfettete, sehr brüchige Leber auf. Im klassischen Fall sind subkapsuläre Hämatome und kurz nach der Eröffnung der Bauchhöhle feine Fetttröpfchen auf der Leberoberfläche zu erkennen. Der Tod ist meist ein Verblutungstod nach Leberruptur.

Der Fettgehalt der Leber nimmt von 12 % bis 15 % Gesamt-Fett in der Trockensubstanz bei gesunden Legehennen mit zunehmender Erkrankung bis 70 % zu. (GREUEL und HARTFIEL, 1968). Gleichzeitig ist eine Zunahme der Palmitinsäure und eine Erhöhung des Oleinsäureanteiles von 19,2 auf 50,7 % des Gesamtfettes festzustellen. Der Laurin-, Stearin-, Linol- und Eicosatriensäuregehalt ist erniedrigt (GREUEL und HARTFIEL, 1968). Die Zunahme des Neutralfettes von 13 % auf maximal 49 % ist besonders auffallend (HARTFIEL, 1970).

Ganz allgemein erschwert die physiologisch weitgestreute Schwankung des Leberfettgehaltes innerhalb einer Legehennenherde die eindeutige Diagnosestellung. Auch sind nicht alle Hennen mit sehr hohen Fettwerten nach Fütterungsversuchen von SPLITTGERBER et al. (1970) in ihrer Legetätigkeit gestört.

Der Schwerpunkt der Forschung zur Klärung der ursächlichen Zusammenhänge liegt auf dem Ernährungssektor. So haben BARTON (1967), BARTON, FLEGAL und SCHAIBLE (1966/67), FIGUEROA (1969), HARTFIEL (1970), HARTFIEL und GREUEL (1970), SOLBERG (1971), SALLMANN und SCHOLE (1971) - siehe auch WRIGHT (1969) - versucht, durch Fütterungsversuche mit verschiedenem Energie- und Proteingehalt das FLS zu erzeugen beziehungsweise zu verhindern. Es wurde der Einfluß von lipotropen Substanzen wie Cholin, Methionin, Cystein, Inositol, Lipocaic und Spurenelementen wie Kupfersulfat und Mangan geprüft. Ferner kamen verschiedene Chemotherapeutika und Antibiotika zur Anwendung.

Als Folge der unsicheren Diagnosestellung schwanken die bisher vorgelegten Untersuchungsergebnisse und die Berichte über therapeutische Erfolge und widersprechen sich teilweise.

In der vorliegenden Arbeit soll versucht werden, zunächst einmal eine Grundlage für weitere Experimente durch Sicherung der Fettleberdiagnose beim lebenden Huhn zu erstellen.

Literatur

Definition der Fettleber

Der Ausdruck "Fettleber" darf nach KALK (1965) erst dann angewandt werden, wenn eine wirklich massive Verfettung vorliegt, etwa dann, wenn ungefähr die Hälfte der Leberzellen im Gesichtsfeld eines Mikroskopes bei mittlerer Vergrößerung Fettvakuolen aufweist. RUBARTH (1967) unterscheidet eine physiologische Fettinfiltration, eine pathologisch einfache Fettinfiltration, bei der es sich lediglich um eine quantitative Änderung des Fettgehaltes handelt, deren Ursachen stets außerhalb der Leberzellen zu suchen sind,und eine degenerative (nekrobiotische) Verfettung, deren Ursachen eine endogene intrazelluläre Zellschädigung ist. Die betroffenen Leberzellen gehen dabei nicht infolge der Verfettung, sondern infolge der Zellschädigung zugrunde.

Aufgrund der komplexen stoffwechselphysiologischen Vorgänge und Regelmechanismen der Leber können die Ursachen einer Leberverfettung sehr zahlreich und vielschichtig sein. URBANECK und SEIDEL (1969) fassen die Ursachen jeglicher Hepatopathie in vier Wirkungsgruppen zusammen:

1. Sauerstoffmangelzustände
2. Ernährungsstörungen
3. toxische Substanzen
4. infektiöse Ursachen.

Kreislaufstörung und Sauerstoffmangel sowie nutritive Faktoren, endokrine Störungen und physikalisch-biochemische Entgleisungen sind nicht voneinander abzutrennen.

Gerade die Chronizität vieler krankhafter Vorgänge in der Leber beruht nach SIEGMUND (1952) auf dem Wechselmechanismus zwischen Blutstrom und Leberzelle, der einen circulus vitiosus auslöst.

SPÖRRI (1969) führt über 60 verschiedene Ursachen an, welche zu einer Pathobiose der Leber führen können. Trotz dieser unterschiedlichen Ursachen, trotz der Vielschichtigkeit und Komplexität der anabolen, katabolen, sekretorischen und exkretorischen Stoffwechselvorgänge in diesem Organ, sind bei einer Erkrankung der Leber die klinischen Symptome auf wenige Reaktionsabläufe beschränkt. Es besteht eine gewisse Uniformität in der Beantwortung der Noxen.

Eine sehr große Anzahl von hepatotoxischen Substanzen, nutritiven oder hämodynamischen Störungen führt zu einer Akkumulation von Fett in der Leber. LOMBARDI (1965) illustriert anhand von drei steatogenen Abläufen,-ausgelöst durch den lebertoxischen Tetrachlorkohlenstoff, das antilipotrope Äthionin und Cholinmangel - die verschieden möglichen Angriffspunkte und Wirkungsmechanismen der Leberzelle. Die resultierenden Gewebsveränderungen sind aber jeweils die gleichen, nämlich eine pathologische Fettansammlung in der Leberzelle.

Der Bromthalein-Exkretionstest

Der Bromthaleintest, andere Bezeichnungen sind Bromsulphalein, Bromsulfalein, Phenoltetrabromthalein oder BSP, gehört zu den chromodiagnostischen Funktionsproben der Leber. Bromthalein ist das Dinatriumsalz der Phenoltetrabromphthaleinsulfonsäure. Das Molekulargewicht beträgt 838.06, der pH Bereich der wässrigen Lösung liegt zwischen 4,5 und 5,5. Im sauren und neutralen Bereich ist BSP farblos, im alkalischen rotviolett. Völlige Dissoziation und maximale Farbtiefe sind bei pH 10,6 erreicht. (MERCK, 1966)

Die erste Grundlage für eine Clearancemethode liefert van SLYKE (1926). DOST wendet 1949 diese Methode erstmals als Nierenfunktionstest bei Menschen an. Er wies nach, daß die Ausscheidung einer Clearancesubstanz einen gesetzmäßigen Verlauf nimmt. DOST (1958) formuliert die Clearance als dasjenige Plasmavolumen, das durch die Tätigkeit eines Organs in der Zeiteinheit einer Minute von seinem Inhalt an irgendeinem ins Auge gefaßten endogenen Stoffwechselprodukt oder auch exogen zugeführtem Stoff befreit wird. Diesen biologischen Eliminationsmechanismus drückt er mit folgender Formel aus:

$$p_t = p_o \cdot e^{-k} \cdot t$$

p_t = Konzentration zur Zeit t

p_o = Anfangskonzentration im Plasma

k = Eliminationskonstante

e = Basis des natürlichen Logarithmensystems

Anhand dieses exponentiellen Verlaufs der Farbstoffelimination aus dem Plasma leitet er die Halbwertszeit, die Gesamtclearance und die fractional clearance ab.

Die theoretischen und methodischen Grundlagen der Ableitungen dieser Formeln sind bei DOST (1954/58), UHLMANN (1954) und CLAUSEN (1954) ausführlich beschrieben.

Diese ursprünglich als renale Clearance entwickelte Funktionsprobe fand bald Eingang in die Diagnostik von Lebererkrankungen. Dazu wurde das Bromthalein verwendet, das nahezu ausschließlich über die Leber ausgeschieden wird und somit die Voraussetzungen eines exponentiellen Eliminationsverlaufes erfüllt.

Dieser Eliminationsvorgang gliedert sich in die Aufnahme des Farbstoffes aus dem Blut, in seine Speicherung und Metabolisierung in den Leberzellen und in die anschließende Exkretion in das Gallensystem. Beim Mensch und Säuger erfolgt der BSP-Metabolismus durch Konjugation an Glutathion. Diese Biotransformation geschieht enzymatisch durch die S-aryl-glutathion Transferase. (PRIESTLY und PLAA, 1970).

Anwendungsbereich des Bromthaleintestes:

Die BSP-Retention kann nach POPPER und SCHAFFNER (1961) zur Erkennung folgender Störungen herangezogen werden:

1 Lebererkrankungen mit einer BSP-Retention

a) Zirrhose
b) Hepatitis
c) Cholestase
d) Karzinom
e) Fettleber

2 Extrahepatische Erkrankungen mit einer BSP-Retention

a) Stauung im Kreislauf und Herzinsuffizienz
b) Fieber
c) Malaria
d) Infektionen
e) Schock
f) Gallenblasenerkrankungen

3 Lebererkrankungen, bei denen diagnostisch nur eine BSP-Retention festgestellt wird

a) Zirrhose ohne Ikterus
b) Anikterische Hepatitis
c) Fettleber

4 Diffuse Lebererkrankungen meist ohne vermehrte BSP-Retention
Intermittierende, unvollständige, extrahepatische Cholestase

KESSEL und PEZOLD (1957) fassen den allgemeinen diagnostischen Wert der BSP-Probe für die Klinik wie folgt zusammen:

1 Eine empfindliche verlaufsprognostische Beurteilung einer ausklingenden Hepatitis

2 Bis zu einem gewissen Grad eine Aussage über das Ausmaß eines Leberparenchymschadens

3 Die mögliche Aufdeckung eines latenten Leberschadens

4 Eine mögliche Beurteilung der Therapie bei methodisch kritischer Versuchsanordnung.

PEZOLD und KESSEL (1957) führten bei Patienten 1246 BSP-Teste durch. Aufgrund der Ergebnisse und tierexperimenteller Untersuchungen kommen sie zu dem Schluß, daß diese Probe die höchste, statisch signifikant gesicherte Empfindlichkeit zur Feststellung von Leberfunktionsstörungen hat.

Die BSP-Probe kann allerdings nicht zur Unterscheidung von Hepathopathien herangezogen werden, sondern zeigt nur auf eine gestörte Exkretion des gesamten Funktionskomplexes der Leber hin. Die Empfindlichkeit, Zuverlässigkeit und weitgehende Leberspezifität sind unbestritten. HERKEN und STAPENHORST (1955), KESSEL, KÖRTGE und PEZOLD (1954), OPPENHEIM, ESSELLIER und ROSENMUND (1951/52), PEZOLD und KESSEL (1957), BEYREDER, RETTENBACHER und DÄUBNER (1966), KONITZER (1958).

Der diagnostische Wert der BSP-Probe zur Erkennung der Fettleber

Als eine der verläßlichsten Leberfunktionsprüfung zur Erkennung einer Fettleber in vivo hat sich besonders der Bromthaleintest erwiesen.

THALER (1966) registriert bei 70 % aller untersuchten Fettleberfälle beim Menschen eine besonders deutliche Verzögerung der BSP-Clearance. KAFFARNIK, GROSS und JUCHEMS (1967) erhalten bei 64 % der untersuchten Patienten mit Fettleber einen pathologischen Ausfall der BSP-Leberfunktionsprobe. ROMMEL und TÖRÖK (1967) bestätigen die Ergebnisse anderer Untersucher, daß der BSP-Test noch am ehesten aussagefähige Werte liefert, zumal die meisten Leberfunktionsproben bei der Fettleber uncharakteristisch ausfallen. IRSIGLER und HRABAL (1968) halten die erhöhte BSP-Retention für das erste blutchemisch faßbare Zeichen einer Fettablagerung in der Leber bei ansonsten normalen Befunden. BÖHLE, ERB und SIEDE (1968) verwenden neben anderen Leberfunktionsproben den Bromthaleintest, um eine Alkoholsteatose der Leber zu diagnostizieren. Von 880 bioptisch gesicherten Fettleberfällen konnten sie bei 78,2 % eine pathologische Retention nachweisen.

KALK (1965) teilt die Fettleber histologisch in drei Stadien ein:

1 reine Fettleber

2 Fettleber mit mesenchymaler Reaktion und Bindegewebsvermehrung

3 Zirrhose als Folge der Fettleber

Nach KALK fallen von den Leberfunktionsproben im Stadium 1, also bei der reinen Fettleber, fast nur die Bromthaleinprobe positiv aus, aber auch die nur im mäßigen Grade von 10 - 20 %.

Erst im Stadium 2 bewegen sich dann noch andere Leberfunktionsproben im pathologischen Bereich. Auch SCHMIDT (1968) erhält bei einer mikroskopisch abgesicherten, hochgradigen Leberverfettung eine verwertbare Bromthaleinretention.

Die Anwendung des Bromthaleintestes in der Veterinärmedizin

Seitdem ROSENTHAL und WHITE (1925) das Bromthalein als brauchbaren Farbstoff zur Erkennung von Hepatopathien in die Humanmedizin einführten, sind außer dieser Leberfunktionsprobe noch zahlreiche weitere Leberfunktionsteste entwickelt worden. SCHÄFER (1951) erwähnt über 170, OPPENHEIM et al. (1951) sogar über 500 und COLES (1969) über 100 verschiedene Methoden.

Doch nur wenige haben sich in der Veterinärmedizin als praktikabel erwiesen.

GREMMEL (1951) wendet im deutschsprachigen Raum den BSP-Test erstmals beim Hund an und stellt fest, daß diese Funktionsprobe Auskunft über die Mitbeteiligung der Leber am Krankheitsgeschehen gibt, wenn der Retentionswert 45 Minuten nach der Injektion 5 % übersteigt. LETTOW (1960) und besonders MIELKE (1959)

befassen sich sehr eingehend mit dem BSP-Test beim Hund, wobei MIELKE in seiner ersten beziehungsweise zweiten Mitteilung einen ausführlichen Rückblick über die verschiedenen Anwendungsmethoden und technischen Modifikationen gibt. Bei Hunden mit pathomorphologisch geschädigter Leber werden in der Mehrzahl der Fälle auch erhöhte Retentionswerte erzielt. Nach den Ergebnissen von LETTOW (1960) ist die Bromsulfophthalein-Exkretion bei keinem der lebergesunden Hunde gestört, bei den kranken in der Mehrzahl der Fälle verzögert.

FREESE (1952) untersucht im Rahmen einer Dissertationsarbeit an 108 Rindern die Brauchbarkeit der BSP-Probe. Er bewertet die festgestellte Retention des Farbstoffes als Ausdruck eines pathophysiologischen Zustandes der Leber.

Die mathematischen Beziehungen der exponentiell verlaufenden BSP-Eliminationskurve wenden MIXNER und ROBERTSON (1957) erstmals beim Rind an und führen den Begriff der fractionalen Clearance als Kriterium der Leberfunktion in die Buiatrik ein. Untersuchungen zur Methodik der Bromsulphaleinprobe an 110 klinisch kranken Rindern führt WITTE (1970) im Rahmen einer Dissertation durch. Sie konnte keinen Vorteil der Bestimmung der Eliminationskonstanten gegenüber der herkömmlichen Retentionsmethode feststellen. Sie empfiehlt bei der routinemäßigen Anwendung der BSP-Probe die Bestimmung der 25 Minutenretention, welche einfacher durchzuführen, und deshalb mit geringeren Fehlermöglichkeiten behaftet ist. Clearance-Untersuchungen mit BSP bestätigen die Ergebnisse der gleichzeitig vorgenommenen Leberbiopsie beim Rind. Sie bilden auch nach SCHULZ, ROSSOW und URBANECK (1960) einen wertvollen Beitrag für die klinische Diagnostik von Lebererkrankungen.

ATKAN (1954), APPEL (1956), CORNELIUS und WHEAT (1957) und SOVA und KOMAREK (1964) empfehlen aufgrund ihrer Untersuchungen die BSP-Belastungsprobe als brauchbare, verläßliche, empfindliche und sowohl einfache als auch unschädliche Leberfunktionsprobe beim Pferd. Besonders eignet sie sich zur Diagnose der Hepatitis acuta und Hepatonecrosis diffusa sowie zur Verfolgung der Dynamik von Lebererkrankungen. SOVA (1964) betont allerdings, daß es auch bei chronischen

Erkrankungen der Atmungsorgane zu Störungen der Blutdurchflußrate in der Leber und somit zu einer erhöhten Retention im Plasma beziehungsweise im Serum kommen kann.

ROSSOW und MIELKE (1962) studieren die BSP-Probe ohne klinische Anwendung beim Schaf. PFEIFFER (1970) wendet die Bromthaleinprobe zur klinischen Leberfunktionsprüfung beim Schwein an. Unterschiede zwischen den Testergebnissen bei Verwendung von Plasma oder Serum oder zwischen der direkten und indirekten Messung kann er nicht feststellen. Aufgrund seiner Untersuchungen ist der BSP-Test eine sichere Methode, Leberfunktionsstörungen beim Schwein zu erkennen.

Erste Literaturangaben über die BSP-Clearance beim Huhn stammen von CAMPBELL (1957 a). An erwachsenen rebhuhnfarbigen Italiener werden geschlechtsbezogene Unterschiede der Leberclearance beobachtet. Anstatt der üblichen Farbstoffdosis von 2-5 mg pro kg KGW, injiziert CAMPBELL 20 mg/kg. Nach seinen Erfahrungen ist die Dosis von 5 mg Farbstoff pro kg KGW, welche vorwiegend in der Humanmedizin und bei Großtieren Verwendung findet, für die Bestimmung der Leberclearance beim Huhn nicht geeignet. Drei bis vier Blutproben zu jeweils 5 ml werden binnen 25 Minuten aus der Flügelvene entnommen. Die unterschiedlichen Exkretionszeiten bei Hahn, Henne und Kapaun bezieht CAMPBELL auf das unterschiedliche Androgen - Östrogenverhältnis bei den untersuchten Tieren. CAMPBELL nimmt an, daß die Ursache der verzögerten BSP-Exkretion Leberzellen mit höherem Östrogengehalt sind. Histologisch wird bei diesen Hennen als einzige Veränderung ein erhöhter intrazellulärer Fettgehalt festgestellt. Trotz körpergewichtsbezogener Standarddosis weichen die Anfangsfarbstoffkonzentrationswerte im Plasma der einzelnen Hennen voneinander ab. Der Verfasser führt dies darauf zurück, daß das

Blutvolumen beziehungsweise der Hämatokritwert nicht in Korrelation mit dem Körpergewicht zunimmt. Bei sehr verfetteten Hühnern kann der hohe Anteil an relativ schlecht durchblutetem, subkutanem und abdominalem Fettgewebe ein Grund dafür sein, daß die berechnete Farbstoffdosis nicht in entsprechender Relation zum Gesamtblutvolumen bei älteren und schweren Tieren steht. 1957 (b) untersucht CAMPBELL den hepatotoxischen Effekt von Seniciphyllin bei jungen rebhuhnfarbigen Italiener. Um die Pathobiose zu veranschaulichen, wird der BSP-Leberclearance-Test verwendet. Gleichzeitig soll damit die Wirkung von Diäthylstilböstrol als Leberschutz gegen den durch die alkaloidhaltige Senecio jacobea L. verursachten Leberschaden ermittelt werden.

1960 untersucht CAMPBELL die Ursache der verschieden schnell ablaufenden Leberfunktion bei 20, 5 1/2 bis 9 Wochen alten Leghornhybriden und die Empfindlichkeit der Leber gegen Seneciphyllin mit Hilfe der BSP-Chromoexkretionsprobe. 4 ml Blut werden jeweils nach der 5., der 10. und der 15. Minute p. inj. aus der Flügelvene entnommen. CAMPBELL (1960) betont in dieser Arbeit, daß beim Huhn die Clearancekurve aussagekräftiger ist als die Messung des Retentionswertes nach einer bestimmten Zeit. Die photometrisch bestimmte Farbstoffretention drückt er durch die prozentuale Änderung der Neigung der Plasmakurve zwischen der 5. und 10. Minute und zwischen der 10. und 15. Minute aus.

Die individuelle Reaktion der Leber verschiedener Hühner gegenüber Seniciphyllin erweist sich als direkt proportional mit der Fähigkeit dieses Organes, den injizierten Farbstoff auszuscheiden.

JULIAN, KREBS und BRAUER (1955) untersuchen die Leberfunktionszusammenhänge mit S^{35} markierten BSP beim Kükenembryo. Sie stellen fest, daß eine

Akkumulation von S^{35} BSP schon beim 8 Tage alten Kükenembryo in der Leber nachweisbar ist, und deren maximale Farbstoffaufnahme innerhalb 5 Minuten nach intravenöser Injektion erreicht ist. Eine Exkretion des Farbstoffes in die Galle erfolgt erst in dem Entwicklungsstadium , in dem die Gallengänge histologisch nachweisbar sind. Auffallend ist, daß erst kurz vor dem Schlupftermin der Farbstoff im Darmkonvolut nachweisbar wird. BRAUER, JULIAN und KREBS (1963) untersuchen ebenfalls mit markiertem S^{35} BSP bei Kükenembryonen den Entwicklungsprozeß der Leberzelle bis zu ihrer vollen Funktionsfähigkeit. Die Konjugation und Speicherungsfähigkeit des Farbstoffes in der Leber sind bereits am 9. Bebrütungstag gut entwickelt. Die Fähigkeit, den Farbstoff in das Gallensystem auszuscheiden, ist erst am 11. Bebrütungstag nachweisbar. Der Unterschied zum erwachsenen Huhn besteht darin, daß das BSP beim Kükenembryo zu einem großen Teil an Glutathion oder an die SH-haltigen Fragmente dieses Tripeptides konjugiert ist, was die längere Verweildauer beim Embryo erklären läßt. Nach der Ansicht dieser Autoren erfolgt eine Konjugation des Bromthaleins beim erwachsenen Huhn nur noch im geringen Maße. KREBS und BAUER (1949) beweisen mit Hilfe von radioaktiven S^{35} BSP bei der Ratte, daß die Kupffer'schen Sternzellen bei der Farbstoffaufnahme aus dem Blut nicht beteiligt sind. Das BSP gelangt direkt aus dem Plasma in die Leberzellen.

CLARKSON (1961) studiert die BSP-Clearance bei Puten durch Vergleich der Farbstoffkonzentration im Plasma mit derjenigen in der Galle und in der Leber. Diese Studien wurden an betäubten Tieren durchgeführt. 5 beziehungsweise 7,5 mg BSP pro kg Körpergewicht werden in die Beinvene injiziert. Die häufigen Blutproben von jeweils 1 oder 2 ml werden durch Einführen eines Polyäthylenschlauches über die Brachialvene in die Herzregion ermöglicht. Insgesamt werden bis zur 60. Minute zwischen 20 und 40 ml Blut entnommen. Anhand seiner Ergebnisse bestätigt CLARKSON die Brauchbarkeit des BSP-Leberfunktionstestes zum Studium der Leberphysiologie und zur Feststellung von Leberfunktionsstörungen.

CLARKSON und RICHARDS (1966) bestimmen die Gesamtdurchblutungsrate der Leber bei nicht anästhesierten Puten mittels der BSP-Clearancemethode nach Ligatur der V. cava posterior oder der V. coccygiomesenterica. Die Resultate werden mit der Normalmethode verglichen. Die dabei festgestellten Unterschiede der Durchblutungsrate werden mit den komplexen venösen Gefäßverzweigungen der aviären Leber erklärt. SOVA, MIKOVA und NEMEC (1968) bestimmen die BSP-Chromoexkretion an klinisch gesunden zweijährigen Rhodeländerhennen. Es wird eine Dosis von 5 mg pro kg KGW gewählt und der Farbstoff in die V. jugularis injiziert, nachdem diese unter Äthernarkose freipräpariert war. An 47 Hennen werden 92 Messungen vorgenommen und die BSP-Elimination durch mehrmalige Blutentnahmen bestimmt. Bei seinen Untersuchungen erfolgt die Farbstoffelimination bei allen untersuchten Hühnern konstant.

DARCEL und BIDE (1970) untersuchen das Plasmaclearanceverhalten von verschiedenen Farbstoffen bei aviärer Erythroblastose. Zur Leberfunktionsprüfung wird das Bromthalein in einer Menge von 5 mg pro kg Körpergewicht injiziert. Auffallend ist bei diesen Ergebnissen, daß nach 5 Minuten post inj. nur noch eine niedrige Farbstoffkonzentration festgestellt werden kann, welche es unmöglicht macht, die 50 % Clearance des Farbstoffes zu messen.

Zur Farbstoffretentionsbestimmung

Die am häufigsten verwendete komplexe Leberfunktionsprobe ist der Bromthaleinausscheidungstest. Von diesem gibt es zahlreiche Varianten.

Entnahmetechnik:

Zur Injektion der berechneten Farbstoffmenge werden leicht zugängliche Venen gewählt. Nachdem die erste Blutmenge von etwa 3 ml für die Leerprobe entnommen ist, wird durch dieselbe Kanüle die berechnete Farbstofflösung injiziert. Die anschließenden Blutentnahmen werden aus dem gleichen Gefäß der gegenüberliegenden Seite durchgeführt, um eine Beeinflussung der Meßergebnisse durch lokal absorbierten Farbstoff zu vermeiden. Wird für die anschließende Blutentnahme die gleiche Kanüle wie zur Injektion verwendet, dann sind die ersten Blutstropfen zu verwerfen, um eventuell in der Injektionsnadel befindliche Farbstoffreste zu entfernen. Die Blutgewinnung muß sorgfältig durchgeführt werden, denn nur einwandfreie, klare und nicht hämolytische Seren können zur Funktionsprüfung herangezogen werden. Die Entnahmezeiten richten sich nach den Bestimmungsmethoden.

Die BSP-Bestimmungen werden grundsätzlich nach zwei verschiedenen Methoden durchgeführt. Bei der direkten Methode kann die Farbstoffretention prozentual auf eine Standardlösung bezogen werden. Beim Säuger wird meist eine 10 mg %ige BSP-Konzentration als Standardlösung gewählt und diese gleich 100 % gesetzt. Entsprechend wird die Eichkurve aufgestellt. Als oberer Grenzwert gilt beim Menschen bei der 45 Minuten Probe eine Retention von 5 %. Oder es wird der Farbstoff in mg % berechnet. Die Bestimmung des Farbstoffgehaltes in mg % drückt den BSP-Anteil in 100 ml Blut aus, welcher noch nicht ausgeschieden ist.

Ferner kann die gemessene BSP-Plasmakonzentration als prozentualer Retentionsindex angegeben werden. Bei dieser Bestimmung werden die Extinktionswerte zweier Blutproben zueinander in Beziehung gebracht. Die erste Konzentrationsmessung liegt erfahrungsgemäß innerhalb der ersten fünf Minuten nach der BSP-Injektion. Bei dieser Berechnung liegt die Voraussetzung zugrunde, daß zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme die höchste Farbstoffkonzentration im Plasma erreicht sein muß. Dieser gemessene Retentionswert wird als 100 % angenommen.

Nach einer festgelegten Zeit wird eine zweite Extinktionsmessung durchgeführt. Ist k_1 zum Beispiel der Extinktionswert der 3-Minutenmessung und k_2 der des zweiten Minutenwertes, so berechnet sich der prozentuale Retentionsindex

$$R\,\% = \frac{k_2 \cdot 100}{k_1}$$

Nach den Erfahrungen von PEZOLD und KESSEL (1957) ist die Zugrundelegung einer 10 mg% Standardlösung zur Berechnung der prozentualen Retentionsrate unexakt, ja falsch, da die so erhaltenen Werte $\pm$ 35 % gegenüber den initialen Maximalkonzentrationen abweichen können. Auch ist die Bezugnahme auf die initiale Maximalkonzentration, die zur Berechnung des prozentualen Retentionsindexes herangezogen wird, unsicher, da die maximale Plasmakonzentration sehr flüchtig ist und diese überhaupt nicht exakt ermittelt werden kann. Wird eine genügend hohe Farbstoffdosis gewählt, dann spielt die Bezugsgröße auf das Körpergewicht oder auf die Körperoberfläche keine Rolle, da eine gesunde Leber eine selbst doppelte Farbstoffdosis innerhalb der empirisch ermittelten Zeitpunkten eliminieren kann.

Die indirekte Methode zur Bestimmung des Leberfunktionszustandes beruht auf der Voraussetzung, daß die BSP-Elimination im Sinne einer

Exponentialfunktion verläuft. Unter dieser Voraussetzung kann eine größere Anzahl von indirekten Größen bestimmt werden, welche die BSP-Eliminationsgeschwindigkeit charakterisieren.

Wie DOST (1954/58) zeigte, ist die Ausscheidungskurve bei der Funktionsprüfung eines Organes im Zeitablauf nicht linear. Die Ausscheidungskurve der Clearancesubstanz nimmt aber einen gesetzmäßigen Verlauf. Die Eliminationsgeschwindigkeit des Farbstoffes ist zu jedem der Zeitpunkte der herrschenden Konzentration y proportional. Fällt diese Konzentration in dem Zeitelement dt um den Betrag dy, so ergibt sich folgende Beziehung:

$$\frac{dy}{dt} = ky$$

Durch Integration dieser Differentialgleichung ergibt sich die den Eliminationsvorgang beschreibende Funktion (UHLMANN, 1954). Sie wird durch folgende Formel dargestellt:

$$y_t = y_o \cdot e^{-k} \cdot t$$

In dieser Formel bedeuten:

y_t = BSP-Konzentration zur Zeit t

y_o = BSP-Konzentration zu Beginn des Versuches

e = Basis des natürlichen Logarithmus

k = Eliminationskonstante

Diese Eliminationskonstante k oder fractional clearance definieren MIXNER und ROBERTSON (1957) als die Neigung der Regressionsgeraden. Diese Neigung der ab-

fallenden Geraden drückt den Anteil des Gesamtplasmavolumens aus, welches pro Minute von dem BSP befreit wird. Der Vorteil dieser indirekten Bestimmungsmethode wird darin gesehen, daß die fractionale Clearance k nur von einer Größe abhängig ist, nämlich der Zeit. Andere Größen, wie injizierte Farbstoffmenge, Blutvolumen, Alter oder Verfettungsgrad des Körpers, sollen keinen Einfluß auf das Untersuchungsergebnis haben. (MIXNER und ROBERTSON, 1956).

Wirklich brauchbare Werte sind nur dann erhältlich, wenn der Abfall der Blutspiegelkurve exponentiell verläuft und die Messungen nicht in dem Zeitabschnitt genommen werden, in der die Neigung der Geraden bei der halblogarithmischen Aufzeichnung einen "Knick" zeigt.

Um die Gesamtclearance der Verlaufskurve zu berechnen, ist es erforderlich, diese oben beschriebene Funktion durch Logarithmierung in folgende Formel zu verwandeln:

$$\ln y_t = \ln y_o - k \cdot t$$

Dadurch wird die Kurve der gemessenen Werte linearisiert. Trägt man diese logarithmisierten Werte auf der Ordinate im arithmetischen Koordinatensystem auf und auf der Abszisse die entsprechende Entnahmezeit (Minuten), so ergibt sich eine Gerade, deren Regression von der Größe der Eliminationskonstanten abhängt.

Der Bromthaleintest als Mikromethode

In der Kinderheilkunde und bei kleinen Versuchstieren ist der Bromthaleintest in der ursprünglichen Form nur begrenzt anwendbar. Große Blutmengen können

hier aus anatomisch-physiologischen Gründen nicht mehrmals entzogen werden. Bei wiederholten Blutentnahmen von je 3 bis 5 ml werden das Fließgleichgewicht der injizierten Farbstoffmenge und der Exkretionskapazität bedenklich gestört. Um die Veränderung des Gesamtblutvolumens, und somit des Blutdruckes und der Blutdurchflußrate minimal zu halten, haben HOFMANN und OETTEL (1954) die Mikromethode eingeführt. Bei ihr ist die notwendige Plasma oder Serummenge wesentlich geringer (0,2 bis 0,1 ml Blut). Anstatt 5 ml Blut beim Kaninchen, Katze und Hund pro Zeiteinheit nehmen zu müssen, kommen diese Verfasser mit 0, 2 ml Blut pro Probe aus. Die Brauchbarkeit dieser Mikromethode demonstrieren HOFMANN und OETTEL durch zahlreiche Versuche.

VOGT und STEHR (1956) beschreiben eine Mikromethode zur Leberfunktionsprüfung mit Bromthalein bei Kleinkindern. Anstatt 0,2 ml Blut (HOFMANN, OETTEL) benötigen VOGT und STEHR nur 0,1 ml. Mit Hilfe einer Spezialkuvette werden die Retentionswerte bei 30 Säuglingen beziehungsweise Kleinkindern bestimmt. Bei vergleichenden Untersuchungen mit der Makromethode liegt die Fehlerbreite bei $\pm$ 0,5 %.

Beim erwachsenen Menschen empfehlen SPIES und TRAUER (1956) aufgrund von 48 Paralleluntersuchungen mit der Makro- und Mikromethode die Mikromethode nur bei pathologischen Fällen, nicht aber bei Grenzfällen. Eine der Gründe der unterschiedlichen Meßergebnisse sehen SPIES und TRAUER (1956) darin, daß bei Arbeiten mit geringen Substanzmengen und höherem Verdünnungsgrad relativ größere Fehlerquellen auftreten.

Auch KESSEL und PEZOLD (1957) können beim erwachsenen Menschen keine Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der BSP-Makromethode und dem Mikrotest finden. Die nicht parallel verlaufenden Resultate führen diese Autoren auf den unterschiedlichen Injektionsort (Kubitalvene) und den Entnahmestellen (Fingerbeere, Ohrläppchen) zurück.

Mit Venenblut sicher ausfallende pathologische Tests lieferten mit Kapillarblut normale Ergebnisse. Am ehesten scheinen noch die 60 Minutenwerte zu übereinzustimmen. Dagegen ergaben vergleichende Untersuchungen zwischen der Makro- und Mikromethode beim Kaninchen Übereinstimmung. Aus den Ergebnissen von KESSEL und PEZOLD läßt sich schließen, daß bei der Mikromethode sowohl der Injektionsort als auch der Entnahmeort ein venöses Gefäß gleicher Größe und gleicher Blutdurchflußrate gewählt werden soll.

Material und Methodik

A Material

Die untersuchten Tiere stammen aus dem Einsendungsgut des Institutes aus den Jahren 1969 bis 1971. Es wurden 160 Hühner ausgewählt. Etwa 80 % der untersuchten Hennen kamen aus Betrieben mit Käfighaltung. 118 dieser Legehennen waren zwischen 26 und 34 Wochen alt, also in voller Produktion. Bei 20 Tieren im Alter zwischen 35 und 70 Lebenswochen fiel die Leistungskurve ab. Sämtliche Tiere waren klinisch gesund und gegen atyp. Geflügelpest und gegen infektiöse Bronchitis schutzgeimpft. Alle Hühner erhielten handelsübliches Futter. Um Unterschiede der BSP-Elimination zwischen den legenden und nicht legenden Hennen zu demonstrieren, wurden 22 sechszehn Wochen alte Junghennen in diese Versuchsanordnung mit einbezogen.

B Methodik

Substanzen:

Die erforderlichen Reagentien zur Herstellung des isotonischen Zitratpuffers bestehen aus 4 Teile 0,9 %ige NaCL und ein Teil 3,8 %iges Natriumzitrat. Mit wenigen Tropfen Zitronensäure wird diese Zitratlösung mit einem pH-Meter auf pH 6,5 eingestellt. Zum Alkalinisieren des BSP-haltigen Plasmas wird 10 %ige Natronlauge verwendet. Zur Kolorimetrie stand ein Eppendorf Photometer zur Verfügung. Verwendet werden Mikrokuvetten mit dem entsprechenden Licht-

schlitz. Gemessen werden die Proben mit einem Hg 578 Filter.

Durchführung der BSP-Mikromethode

Zur Leberfunktionsprüfung wurde die Mikromethode nach HOFMANN und OETTEL (1954) modifiziert. Eine Änderung war erforderlich, da der Hämatokrit der Legehenne nicht analog dem des Säugers ist. Nach MEDWAY und KARE (1958), BIERER, ELEAZER und ROEBUCK (1964), STURKIE und TEXTOR (1965) sowie LÖLIGER und SCHUBERT (1967) haben gesunde und geschlechtsreife Hennen einen Hämatokrit zwischen 29 und 31 %. Aufgrund dieser Blutwerte wird ein durchschnittlicher Hämatokrit von 30 angenommen. Zur BSP-Probe wird das 5 %ige Dinatriumsalz der Phenoltetrabromphthaleinsulfonsäure "Bromthalein" in wässriger Lösung der Firma E. Merck, Darmstadt, verwendet. Wegen der geringen entnommenen Blutmenge wird in Anlehnung an CAMPBELL 20 mg Bromthalein pro kg Körpergewicht injiziert. Die Injektion erfolgt mit 1 ml Tuberkulinspritzen; als Kanülen dienen Nr. 1 Einwegnadeln und zur Blutentnahme werden 0,2 ml Blutzuckerpipetten verwendet. Als Vorlage wird 1,14 ml isotonische Zitratlösung in die Zentrifugenröhrchen gegeben. Diese Zitratvorlage wird deshalb so gewählt, um auch nach Zugabe der NaOH bzw. der kompensatorischen Zitratlösung ein Verdünnungsverhältnis von 1 : 10 zu bewahren. Für die Injektion des Farbstoffes und für die Entnahme der Blutprobe zur Leerwertbestimmung werden die Venen benützt, die medial über die Tarsalgelenke verlaufen oder die Vv. thoracales. Für die wiederholten Blutentnahmen kommen die Flügelvenen in Betracht. Mit der Skalpellspitze wird die Brachialvene im Bereich des Ulnargelenkes punktiert. Ohne Stauen oder Abpressen des Gefäßes werden aus dem leicht fließenden Blutstrom die erforderliche Blutmenge entnommen, und die Wunde dann mit einem Tupfer gestillt.

Um sich über die sichere intravenöse Lage der Nadel zu vergewissern, wird vor der Farbstoffinjektion Blut in die Spritze aspiriert, um dann die

berechnete Bromthaleinmenge zügig zu applizieren. Die Stoppuhr wird erst nach Beenden der Injektion in Gang gesetzt. Es werden nach 3, 8, 13, 23 und 30 Minuten jeweils 0,2 ml Blut entnommen und in der Zitratvorlage durch mehrmaliges Aufziehen in die Blutzuckerpipette gut gemischt. Das Zitratblutgemisch wird 20 Minuten bei 3.000 rpm zentrifugiert. Das so gewonnene Zitratplasmagemisch wird mit einer 1 ml Pipette, an der ein Peleusball montiert ist, in ein frisches Zentrifugenröhrchen übertragen.

Der Überstand wird nicht wie bei HOFFMANN und OETTEL halbiert, sondern es werden nur 0,32 ml = 25 % des Überstandes in zwei weitere Röhrchen gegeben. Auf diese Weise läuft man nicht Gefahr, das Sediment aufzuwirbeln. In das eine Zentrifugenröhrchen wird 0,03 ml (25 % von 0,12 ml) 10 %ige Natronlauge gegeben, um das etwa vorhandene Bromthalein als Farbumschlag messen zu können. In das zweite Röhrchen kommt die gleiche Menge Citratlösung als Kompensationslösung. Der Ansatz ist im Zentrifugenröhrchen technisch einfacher als in der Mikrokuvette.

Die Eichkurve wird nach Angaben von HOFMANN und OETTEL aufgestellt. Unter Berücksichtigung des unterschiedlichen Plasmavolumens mußte die Vorlage entsprechend geändert werden. In jeweils 57 ml Zitratpuffer werden je 6 ml 10 %ige NaOH gegeben. Damit wird eine Verdünnungsreihe von jeweils 7 ml einer 0,5 mg % bis 30 mg %igen Bromthaleinlösung aufgestellt. Die Mittelwerte der Meßergebnisse ergeben bei sechs Bestimmungen eine zwanglose Gerade, die durch den Nullpunkt im Koordinatensystem geht.

In diesen Untersuchungen wurden die Mittelwerte der prozentualen BSP-Konzentration während der verschiedenen Zeitabschnitte bestimmt.

Zusätzlich wurde der BSP-Anteil in mg% berechnet. Um bei der Berechnung die von PEZOLD und KESSEL (1957) erwähnten unsicheren Faktoren zu vermeiden, wurde auf die injizierte Gesamtdosis Bezug genommen und diese als 100 % festgelegt. Von den indirekten Eliminationsgrößen wurde die fraktionierte Clearance (k) und die Verlaufskurve der Gesamtclearance bestimmt.

Kontrolle der BSP-Ergebnisse

Die Kontrolle der BSP-Leberfunktionsprüfung erfolgt durch die anschließende pathologisch anatomische und histologische Untersuchung der Leber und durch die Gesamtfettbestimmung derselben. Das Töten der Tiere geschieht durch Schlagbetäubung und durch Durchtrennung der Jugularisgefäße hinter der Ohrscheibe. Grundsätzlich werden außer den 22 Junghennen nur Hühner weiterverwertet, deren Ovar voll aktiv ist. Alle werden einer mikrobiologischen Kontrolluntersuchung unterzogen, wozu Organproben aus Herz und Leber entnommen werden.

Histologische Untersuchung der Leber

Für die histologische Weiterverarbeitung werden jeweils zwei Teile aus beiden Leberlappen in Lillie's neutral gepuffertem 10 %igen Formalin beziehungsweise in Bakers Calcium Cadmium Formalin fixiert.(Mc MANUS und MOWRY, 1964). Paraffinschnitte werden mit H.E. und die Gefrierschnitte mit alkohollöslichem Bibricher Scharlachrot gefärbt (Chroma 7009). Als Gegenfärbung dient Hämalaun.

Die Klassifizierung des Verfettungsgrades erfolgt in Anlehnung an KALK (1965) und KREMER et al. (1969).

Quantitative Gesamtfettbestimmung

Die quantitative Gesamtfettbestimmung aus der Leber erfolgt durch Extraktion mit lipophilen Fettlösungsmitteln, weil "Direkte Angaben über den gewichtsbezogenen prozentualen Fettgehalt des Lebergewebes sich mit Hilfe der histologischen Schätzmethode nicht bestimmen lassen" (KREMER, KÖSSLING, LANGE und VICTOR 1969).

Vor dem Wiegen der Leber werden die Gallenblase und das perihepatische Fett sorgfältig abgetrennt. Das gesamte restliche Lebergewebe wird grob zerkleinert und nachdem das störende Bindegewebe des Gallengangsystems entfernt ist, in 20 ml Einwegspritzen gefüllt. Nach FARR und COUCH (1968) sind Analysenfehler in der Fettbestimmung möglich, wenn nicht das gesamte Lebergewebe zur Fettanalyse herangezogen wird. Aufgrund ihrer Beobachtungen ist die Fettverteilung im Lebergewebe der Legehenne nicht uniform. Die Gesamtlipidextraktion der Leber erfolgt auf zwei verschiedene Weisen:

a) mit der Soxhletapparatur
b) mit der kombinierten Methode nach FOLCH (1957) und SPERRY (1955)

Das Homogenisieren der Leber geschieht mit einem Ultraturraxgerät in der 20 ml Spritze. Um ein Erwärmen des Lebergewebes zu vermeiden, wird der Ultra-Turraxdrehstab vorher gekühlt.

Fettbestimmung nach Soxhlet

Für die Gesamtfettbestimmung nach der Soxhletmethode werden jeweils 3 g des so gewonnenen Leberbreies in vorher austarierte Extraktionshülsen

gespritzt und 6 Stunden lang extrahiert. Anstelle von Äther oder Petroläther wird das nicht feuergefährliche Dichlormethan Merck 6050 verwendet. Das Abwiegen des Leberbreies muß zügig vor sich gehen, da Wiegefehler durch Verdunstung leicht auftreten. Der Fettextrakt wird im Auffangkolben im Vakuumtopf bis zur Gewichtskonstanz eingedampft. Als hygroskopisches Material wird Calciumchlorid zugesetzt. Jeder Untersuchungsgang wird doppelt durchgeführt. Die Gesamtfettbestimmung und die Bestimmung des Wassergehaltes beziehungsweise des Trockengewichtes der Leber geschieht mit der Methode nach FOLCH und SPERRY.

In besonders angefertigten Zentrifugenröhrchen mit etwa 45 ml Fassungsvermögen (35 mm x 75 mm bis zum Halsansatz) und mit einem Normschliff 14/23 versehen wird etwa 1 g $\pm$ 10 mg homogenisiertes Lebergewebe aus der bereits erwähnten 20 ml Einwegspritze gespritzt. Anstatt einer Nadel wird ein entsprechend langer Teflonschlauch verwendet, um den Leberbrei sicher am Röhrchenboden zu deponieren. Das Leergewicht des Glasröhrchens wird auf der Analysenwaage bestimmt. Etwa 10 ml Aceton wird dem abgewogenen Leberhomogenat hinzugefügt. Es wird darauf verzichtet, auf 1.000 mg genau einzuwiegen, da der Verdunstungsfehler durch das zeitaufwendige Wiegen zu groß wird. Bei der prozentualen Berechnung wird auf die tatsächliche Einwaage Bezug genommen. Mit einem umgebogenen Spatelende werden das an der Glaswand klebende Lebergewebe sorgfältig abgekratzt und die etwa haftenden Leberpartikel am Spatel, am Röhrchenhals oder Glasstopfen mit Aceton abgespült. Anschließend wird diese Suspension mit einer Schüttelmaschine fünf Minuten lang geschüttelt. Mit einem Vakuum-Rotationsverdampfer wird unter Stickstoff-Fluß bei einer Wasserbadtemperatur von 40 Grad die Suspension eingedampft. Bis zum Erreichen der Gewichtskonstanz bleiben die Röhrchen im Exsikkator,

in welchem mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe ein Teilvakuum hergestellt wird. Als Trocknungsmittel wird Calciumchlorid verwendet. Bei einer Verweildauer von 36 bis 48 Stunden im Exsikkator, der sich während der Trocknungszeit bei 40 Grad Celcius im Brutschrank befindet, sind bei den Zwischenwägungen der Analysenröhrchen keine Gewichtsunterschiede mehr festzustellen. Die Differenz zwischen dem Rückstand der Einwaage und dem Leergewicht des Zentrifugenröhrchens ergibt das Trockengewicht der Leber. Der Wassergehalt wird aus der Differenz des Rückstandes und der Einwaage berechnet.

19 ml Chloroform - Methanolgemisch werden dem eingedampften Lebergewebe hinzugefügt.

Falls erforderlich, werden die verkrusteten Organteile mit einem Spatel zerkleinert, im Schüttelapparat geschüttelt und 1 Stunde oder länger gut verschlossen stehen gelassen. Diese Gewebsaufschwemmung wird anschließend durch einen fettfreien Filter filtriert. Das Filterpapier wird vorher mit einigen Tropfen Lösungsmittelgemisch angefeuchtet.

Jeweils 2mal 5 ml des Filtrates kommen pro Analysengang in besonders angefertigte Zentrifugenröhrchen (20 ml Fassungsvermögen, 25 mm breit, 75 mm bis zum Schliffansatz). Vorher wird das Leergewicht bestimmt.

Das Waschen und Trennen der lipid- und nicht lipidhaltigen Anteile geschieht durch Zugabe von 1 ml 0,04 % CaCl. Anstatt das getrübte Gemisch mit einem Glasstab gut zu durchmischen, werden die Röhrchen 5 Minuten lang im Schüttelapparat geschüttelt und im verschlossenen Zustand 8 Minuten lang bei 2.500 Umdrehungen zentrifugiert. Das Zentrifugat ist klar in zwei Phasen getrennt. Ein störender Interphasenbereich tritt nicht auf. Die obere, nicht lipidhaltige Phase wird mit der Wasserstrahlpumpe vorsichtig abgesaugt.

Vorteilhaft erweisen sich die Zentrifugenröhrchen mit dem kleinen Durchmesser, da die klare Interphasengrenze sehr deutlich erkennbar ist, so daß man nicht Gefahr läuft, lipidhaltige Flüssigkeitsanteile der unteren Phase mit abzusaugen. Als nächstes wird die Innenwand des Zentrifugenröhrchens mit etwa 1,5 ml reiner oberen Phase bestehend aus 3 T. Chloroform, 48 T Methanol und 47 Teile Wasser (FOLCH, LEES und STANLEY, 1957) so vorsichtig wie möglich gespült, damit die untere Phase durch die Spülflüssigkeit nicht gestört wird.

Die obere Schicht wird erneut abgesaugt. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt. Schließlich wird zur unteren lipidhaltigen Phase 1,5 ml Methanol hinzugefügt.

Die gravimetrische Gesamtlipidbestimmung erfolgt durch Verdampfen der Lösungsmittel unter den gleichen Bedingungen wie bei der Bestimmung des Wassergehaltes im Lebergewebe.

Statistische Absicherung der Resultate

Es wurde bestimmt, ob zwischen den Mittelwerten der Extinktionsmessungen bei den sechs verschiedenen Tiergruppen ein signifikanter Unterschied besteht. Dies wurde nach dem t-Test durchgeführt, nachdem die Voraussetzungen für diesen Test erfüllt waren.

Die Voraussetzungen für den t-Test sind gegeben, wenn

1 die Stichproben aus einer Normalverteilung stammen,
2 die Stichproben voneinander unabhängig sind und
3 ihre Varianz nicht signifikant verschieden ist.

Die letztere Voraussetzung kann mit Hilfe des F-Testes überprüft werden. (WEBER, 1967).

Besprechung der Ergebnisse

Anhand der histologischen und biochemischen Untersuchungsbefunde wurden die der Leberfunktionsprüfung unterworfenen 160 klinisch gesunden Hennen in sechs Gruppen eingeteilt und dann die Resultate der BSP-Leberfunktionsprobe für jede Gruppe zusammengestellt und mit den Ergebnissen der anderen Gruppen verglichen.

Gruppe 1 sind 16 Wochen alte nicht legende Junghennen. Die histologische Untersuchung ihrer Leber ergab keinerlei, als pathologisch zu beurteilende Gewebsveränderungen. Die errechneten Mittelwerte des Leberfettgehaltes betrugen 13,23 ± 4,91 bezogen auf das Trockengewicht und 4,26 ± 1,53 bezogen auf das Naßgewicht nach Sperry, bzw. 3,87 ± 1,35 nach Soxhlet mit Dichlormethan.
Die bakteriologische Untersuchung verlief in jedem Fall negativ.

Gruppe 2 sind 22 Legehennen, deren Lebern histologisch ebenfalls keine pathologische Veränderungen zeigten. Der Gesamtfettgehalt beträgt 17,24 ± 2,65 (Trockengewicht) 5,04 ± 0,84 nach Sperry (Naßgewicht) und 4,73 ± 1,19 nach Soxhlet.
Bakteriologisch wurden bei 3 Tieren ein geringgradiger (+) Keimgehalt an E.coli und bei einem Tier (+) Keimgehalt an vergrünenden Streptokokken nachgewiesen.

Gruppe 3 - Hier handelt es sich um 37 gesunde Legehennen, in deren Lebern histopathologische Veränderungen verschiedener Natur und unterschiedlichen Ausmaßes vorlagen. Ihnen allen ist aber gemeinsam, daß histologisch keine Leberverfettung feststellbar war.

Von diesen Hennen konnten bei 7 Tieren (18,9 %) in der Leber regellos verstreut nekrobiotische Herde festgestellt werden. Bei größerem Ausmaß waren diese Gewebsschäden bereits bei Betrachtung der histologischen Schnitte mit bloßem Auge erkenntlich. Bei kleineren Herden waren die Leberzellen etwa um das zweifache vergrößert. Eine deutliche Zellkernhyperplasie und Zellkernhyperchromasie mit beginnenden Erscheinungen des Kernzerfalls waren augenfällig. Bei größeren Nekrosen bildete das kaum noch strukturierte, homogen eosinophile Zytoplasma flächenhafte Herde, in denen einzelne Zellfragmente und Kerntrümmer erkennbar waren. Diese Herde waren meist von einem Saum aus vorwiegend lymphozytären Zellen umgeben. Heterophile Leukozyten waren in sehr unterschiedlichem Ausmaß beteiligt. Bei weiteren sieben Legehennen lagen hochgradig erweiterte Sinusräume vor, die mit schwach eosinophilem Material gefüllt waren. Die anschließenden Leberzellbalken waren zu Grunde gegangen. Bei 12 Hennen konnten vermehrt kleine Lebernekroseherde erkannt werden. Bei den restlichen 11 untersuchten Hennen dieser Gruppe verteilten sich die Leberveränderungen folgendermaßen:

4 Hennen zeigten generalisierte vakuolige Entartung,
2 Tiere generalisierte Retikulose,
1 Henne kleine herdförmige Nekrobiosen mit reaktiver Entzündung;
bei weiteren 2 Hennen waren kleine hämorrhagische Extravasate und bei jeweils einer Henne Gallengangsödem ohne sonstige erkennbare Veränderungen beziehungsweise Leberzirrhose zu sehen.

Der durchschnittliche Gesamtfettgehalt war 16,87 % $\pm$ 4,10 (Trockengewicht), 5,14 $\pm$ 1,46 nach Sperry (Naßgewicht) und 4,61 $\pm$ 1,23 nach Soxhlet. Bakteriologisch wurde aus den Lebern bei 7 Hennen (+) E. coli und einmal (+) nicht hämolysierende Staphylokokken und einmal (++) Pasteurella hämolytika isoliert.

Die weiteren Gruppen 4 bis 6 sind insgesamt dadurch gekennzeichnet, daß histologisch unterschiedliche Verfettungsgrade festgestellt wurden. Die Einteilung erfolgte nach dem System von KALK (1965) und nach KREMER und Mitarbeiter (1969) in:

1 geringgradige Verfettung
2 mittelgradige und
3 hochgradige Verfettung.

Gruppe 4: 29 klinisch gesunde Legehennen zeigten eine geringgradige staubförmige, vorwiegend zentrolobuläre Verfettung. Bei 2 (6,8 %) dieser Tiere sind vereinzelte kleine Nekroseherde feststellbar, die denen bei den nicht verfetteten Lebern durchaus entsprachen. Der durchschnittliche Gesamtfettgehalt betrug 20,71 % $\pm$ 5,36 (Trockengewicht), 6,20 $\pm$ 1,69 (Naßgewicht) nach Sperry und 5,21 $\pm$ 1,33 nach Soxhlet.

Bakteriologisch wurde aus den Lebern bei 5 Hennen E. coli (+), bei 2 Hennen (++) und bei einer Henne (+) nicht haemolysierende Staphylokokken isoliert.

Gruppe 5 umfaßt 23 klinisch gesunde Tiere mit mittelgradiger, meist diffuser, großtropfiger Verfettung der Leber ohne bevorzugte Lokalisation.

Die Kerne von Zellen, in denen Cytoplasma Fett-Tropfen nachzuweisen waren, zeigten keine Degenerationserscheinungen. Bei 6 (26 %) dieser Legehennen konnten im selben Umfange wie in Gruppe 3 und Gruppe 4 nekrobiotische Herde festgestellt werden. Der Gesamtfettgehalt betrug 25,03 % $\pm$ 3,62 (Trockengewicht) beziehungsweise 7,48 % $\pm$ 1,58 (Naßgewicht) nach Sperry und 6,82 % $\pm$ 1,52 nach Soxhlet.

Gruppe 6: Hier wurden 27 Tiere zusammengefaßt, bei denen im mikroskopischen Blickfeld bei mittlerer Vergrößerung mindestens 50 % der Leberzellen verfettet waren. Bei 12 Hennen ging der Verfettungsgrad so weit, daß die Leberzellstruktur durch die hochgradige Fettakkumulation weitgehend verloren gegangen war. Die Kerne der betroffenen Zellen waren zum größten Teil noch erstaunlich gut erhalten.

Bei ~~diesen Lebern~~ konnten bei 8 (29 %) nekrobiotische Herde diagnostiziert werden, wie sie bei den anderen Versuchsgruppen beschrieben worden sind. Diapedesisblutungen größeren Ausmaßes sind nur bei den sehr hochgradig verfetteten Lebern anzutreffen. Der durchschnittliche Fettgehalt bei dieser Gruppe ist 41,61 % $\pm$ 11,28 (Trockengewicht), 13,80 % $\pm$ 6,21 (Naßgewicht) nach Sperry und 14,10 % $\pm$ 5,83 nach Soxhlet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß mit zunehmendem Fettgehalt der Leber die Standardabweichungen des Körpergewichtes, der Lebergewichte, des Trockengewichtes der Leber und deren Gesamtfettgehalt zunehmen.
(Siehe Tabelle 3 - 4).

Die BSP-Extinktionsmessungen ergeben bei Gruppe 1 (16 Wochen alte Junghennen) folgende Ergebnisse. Die 3 Minutenwerte sind 1,497 $\pm$ 0,256, die prozentuale Farbstoffretention beträgt 72 % beziehungsweise 17 mg % (Tab.1). Analog zu den Ergebnissen der Extinktionsmessungen ist der Verlauf der Gesamtclearancekurve (Siehe Abb. 3). Die Eliminationskonstante k beträgt 0,053 zwischen der 8. und der 23. Minute, die Werte der fractionalen Clearance k zwischen der 8. und der 13. Minute sind 0,025 und zwischen der 13. und der 23. Minute 0,055.

Gruppe 2: Die Mittelwerte der BSP-Extinktionsmessungen betragen bei der 30 Minutenmessung 0,128 $\pm$ 0,107.
Die prozentuale Bromthalein Retention beträgt 5,0 %, der Plasmaanteil des nicht ausgeschiedenen Farbstoffes 1,5 mg % (Siehe Tab. 1). Die In Plasmakonzentration bei 3 Minuten beträgt 1,93 $\pm$ 0,11 und die durchschnittliche Eliminationszeit zwischen der 13. und der 30. Minute 0,051. Die fractionale Clearance k ist 0,059 zwischen der 13. und der 23. Minute und 0,029 zwischen der 23. und der 30. Minute. Die Regressionsgerade trifft nach 36 Minuten die Zeitachse. Die hohen Standardabweichungen zeigen, daß die Exkretionsfunktion auch bei klinisch gesunden Legehennen mit einer histologisch unveränderten Leber großen Standardabweichungen unterliegt.

Bei Gruppe 3 ist die prozentuale BSP-Retention 4,9 % beziehungsweise 1,5 mg %. Die Extinktionsmessung bei 30 Minuten beträgt 0,130 $\pm$ 0,103. Die fractionale Clearance k beträgt zwischen der 13. und der 23. Minute 0,047 und zwischen der 23. und der 30. Minute 0,044. Während die In Plasmakonzentration bei 3 Minuten mit 2,09 $\pm$ 0,10 höher ist als die der Gruppe 2 (1,93 $\pm$ 0,11), sind die übrigen Befunde der Exkretionsprobe denen der Gruppe 2 ähnlich (Tab.1 u.7).

Bei Gruppe 4 handelt es sich um Legehennen mit einer geringgradigen Leberverfettung. Die BSP-Exkretionsrate der Leber ist bei dieser Tiergruppe, verglichen zur Gruppe 2 und Gruppe 3, deutlich verzögert . Die prozentuale BSP-Retention beträgt bei 30 Minuten 7,3 % beziehungsweise 2,3 mg %. Die Mittelwerte der 30 Minuten Messung sind 0,198 $\pm$ 0,118. Diese Stichprobe weist wie alle untersuchten Tiergruppen ebenfalls eine hohe Streuung auf. Entsprechend den prozentualen Retentionswerten sind die Ergebnisse der fractionalen Clearance kleiner (0,027; 0,045) und die Verlaufskurve der Gesamtclearance unterscheidet sich entsprechend der verzögerten BSP-Exkretion. (Siehe Tab. 2 und Abb. 2).

Gruppe 5: Bei den Hennen mit einer mittelgradigen Leberverfettung sind die Unterschiede der BSP-Retention zu den Gruppen 2 bis 4 noch ausgesprochener. Hier ist die prozentuale BSP-Retention bei 30 Minuten bereits 11 % beziehungsweise der Farbstoffanteil im Plasma beträgt noch 3,5 mg %. Die 30 Minutenextinktion ist 0,292 $\pm$ 0,260. Verglichen zur Gruppe 2 und Gruppe 3 sind die Durchschnittswerte der 30 Minuten-Extinktionsmessung mehr als doppelt so hoch. Analog zu den direkten Bestimmungsergebnissen verhalten sich die Ergebnisse der indirekten BSP-Bestimmungsmethode. Hier beträgt die fractionale Clearance 0,024 zwischen der 13. und der 23. Minute und 0,018 zwischen der 23. und der 30. Minute.

Gruppe 6: Legehennen mit einer hochgradig verfetteten Leber unterscheiden sich in den Extinktionsmessungen zur Gruppe 5 nicht wesentlich. Trotz des bedeutend höheren Fettanteils in der Leber liegen die BSP-Retentionsergebnisse teilweise niedriger (Siehe Tab. 2). So beträgt bei dieser Gruppe die prozentuale BSP-Retention bei 30 Minuten 9,9 % beziehungsweise 3,5 mg %. Diese Werte sind wie bei Gruppe 5 doppelt so hoch als bei den Legehennen mit nicht verfetteten Lebern. Die 30 Minuten-Extinktionsergebnisse sind mit 0,300 $\pm$ 0,174

am höchsten verglichen zu den Legehennen der Gruppen 2 bis 5. Anhand der Standardabweichungen ist die Stichprobe homogener als die der übrigen untersuchten Tiergruppen. Abweichend zu den Gruppen 4 und 5 sind die Resultate der fractionalen Clearance. In dem Zeitabschnitt zwischen der 13. und der 23. Minute ist die Exkretionskapazität erstaunlich hoch (0,046). Nicht aber zwischen der 23. und der 30. Minute. Hier ist die fractionale Clearance 0,025 um fast die Hälfte kleiner als die der Gruppen 3 und 4.

Vergleicht man die Verlaufskurven der Gesamtclearance (Abb. 1-3) zwischen den Gruppen 2 bis 6, dann wird offensichtlich, daß Lebern mit einem verschieden hohen Fettanteil eine verschieden lange Bromthaleinausscheidungszeit haben. So trifft bei Gruppe 2 die Gerade bereits bei 36 Minuten auf die Zeitachse, bei Hennen mit hochgradig verfetteten Lebern bildet diese Gerade erst bei 60 Minuten einen Schnittpunkt mit der Zeitachse. Die Regressionsgerade der Gruppe 5 durchschneidet die Verlaufskurve der Gruppe 6 bei 30 Minuten. Verfolgt man diese Gerade bis zur Zeitachse, dann trifft diese die Abszisse erst bei 70 Minuten - erst 10 Minuten später als die der Gruppe 6.

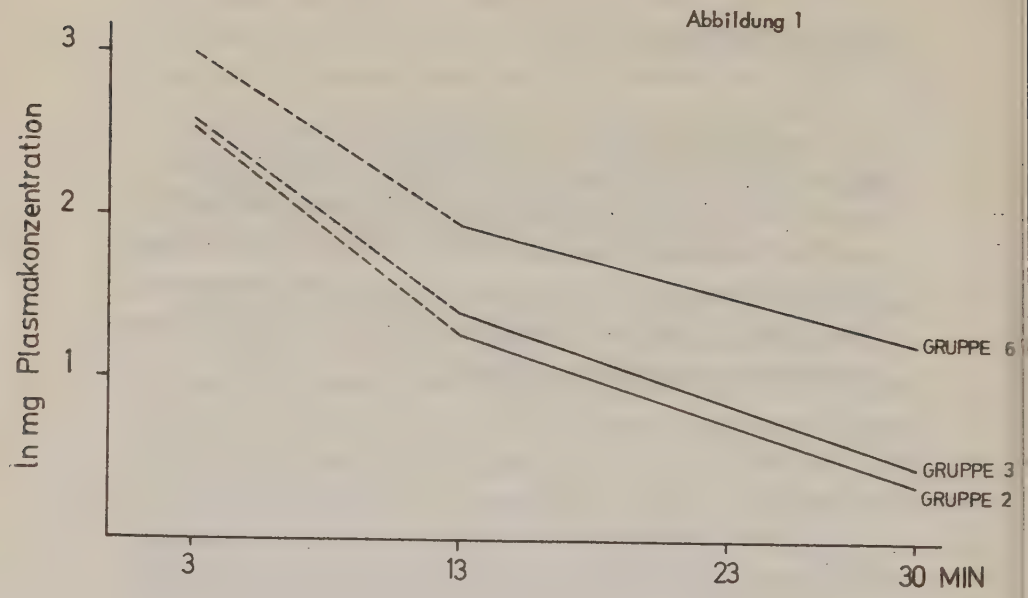
Ebenfalls drücken sich diese Unterschiede im Verfettungsgrad der Lebern durch die BSP-Retentionswerte aus. Trotz der hohen Standardabweichungen ist es möglich, anhand der Extinktionsmessungen den BSP-Retentionsbestimmungen und den Durchschnittswerten der Gesamtclearance und der fractionalen Clearance Legehennen mit verfetteter und nicht verfetteter Leber zu unterscheiden.

Nebenwirkungen mit tödlichem Ausgang traten von insgesamt 230 der BSP-Leberfunktionsprobe unterzogenen Hennen bei einer Henne (0,43 %) auf. Bei fünf Hennen wurde kurz nach der Injektion des Farbstoffes Schnabelatmen, Schließen der Augen, Herabsinken des Kopfes, Blaßwerden des Kammes und Zittern der Extremitäten beobachtet. Der Blutdruck war sehr erniedrigt. Die Tiere erholten sich zwischen 10 Minuten und einer Stunde.

Ergebnisse des t-Testes:

Vergleicht man die Mittelwerte der Extinktionsmessungen zwischen der 13., 23. und der 30. Minute zwischen Gruppe 6 und den Legehennengruppen 2 und 3 und Gruppe 4, dann besteht ein signifikanter Unterschied von 99 %. Werden die Extinktionswerte zwischen den hoch- und mittelgradig verfetteten Lebern, also mit den Gruppen 5 und 6 verglichen, dann ist der Unterschied 90 % signifikant. Werden die Gruppen 6 und Gruppe 1 verglichen, dann besteht kein signifikanter Unterschied.

BROMTHALEIN-GESAMTCLEARANCE



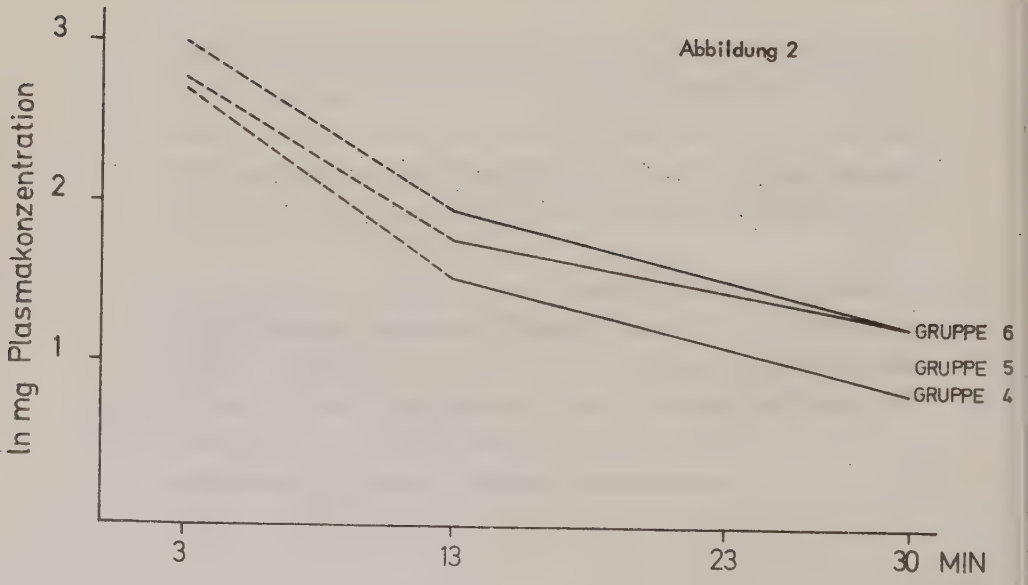


Abbildung 3

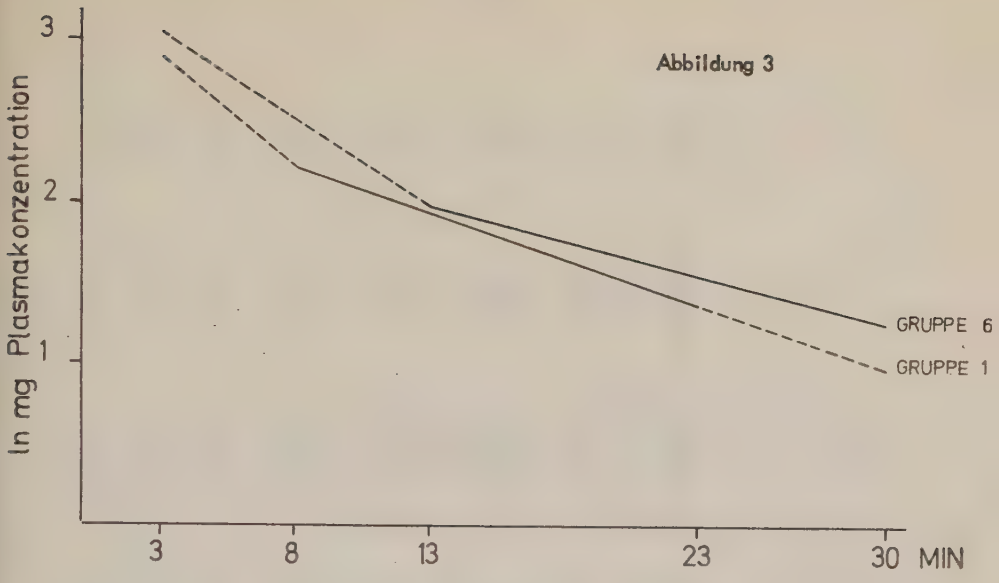


Tabelle 7

Fractionale Clearance k der untersuchten Tiergruppen

	13.-23. Minute	23.-30. Minute
Gruppe 1	0,025	0,055
Gruppe 2	0,059	0,029
Gruppe 3	0,047	0,044
Gruppe 4	0,027	0,045
Gruppe 5	0,024	0,018
Gruppe 6	0,046	0,025

Ergebnisse der Bromthalein-Extinktionswerte

Tabelle 1 (Leber ohne Verfettung)

	Zeit	Anzahl d. Tiere	Mittelwert $\bar{x}$	Standardabweichung	Varianz	Bromthalein %	mg %
Gruppe 1	3′		1.479	±0.256	0.065	72.0	17.0
	8′	22	0.760	±0.175	0.031	37.7	8.0
	13′		0.529	±0.121	0.015	30.0	7.0
	23′		0.342	±0.098	0.010	17.0	4.0
Gruppe 2	3′		1.225	±0.404	0.163	48.0	14.4
	13′	22	0.307	±0.159	0.025	12.0	3.6
	23′		0.174	±0.111	0.012	6.6	2.0
	30′		0.128	±0.107	0.012	5.0	1.5
Gruppe 3	3′		1.187	±0.334	0.112	45.1	13.8
	13′	37	0.343	±0.183	0.033	13.4	4.1
	23′		0.208	±0.137	0.019	8.2	2.5
	30′		0.130	±0.103	0.011	4.9	1.5

Ergebnisse der Bromthalein-Extinktionswerte

Tabelle 2 (Leber mit Verfettung)

	Zeit	Anzahl d. Tiere	Mittelwert $\bar{x}$	Standardabweichung	Varianz	Bromthalein %	mg %
Gruppe 4	3′		1.341	±0.202	0.041	49.7	15.6
	13′	29	0.391	±0.182	0.033	14.6	4.6
	23′		0.256	±0.147	0.022	10.0	3.0
	30′		0.198	±0.118	0.014	7.3	2.3
Gruppe 5	3′		1.368	±0.312	0.097	51.0	16.0
	13′	23	0.501	±0.317	0.100	18.6	5.9
	23′		0.361	±0.295	0.087	13.2	4.2
	30′		0.292	±0.260	0.068	11.0	3.5
Gruppe 6	3′		1.770	±0.417	0.174	51.7	20.7
	13′	27	0.601	±0.213	0.045	20.0	7.0
	23′		0.384	±0.180	0.033	12.8	4.5
	30′		0.300	±0.174	0.030	9.9	3.5

Mittelwerte und Standardabweichungen

Tabelle 3 (Leber ohne Verfettung)

	Körpergewicht in kg:	Lebergewicht in g:	Trockengewicht d. Leber in %	Fettgehalt bzw. Naßgewicht der Leber in % nach Soxhlet	nach Sperry	Fettgehalt d. Leber Trockengewicht in % nach Folch
Gruppe 1	1.183	21.38	31.77	3.87	4.20	13.23
	±0.095	± 5.98	± 1.43	± 1.35	± 1.53	± 4.91
Gruppe 2	1.501	26.62	29.43	4.73	5.04	17.24
	±0.120	± 4.13	± 0.92	± 1.19	± 0.84	± 2.65
Gruppe 3	1.531	30.00	30.29	4.61	5.14	16.87
	±0.229	± 5.48	± 1.17	± 1.23	± 1.46	± 4.10

Mittelwerte und Standardabweichungen

Tabelle 4 (Leber mit Verfettung)

	Körpergewicht in kg:	Lebergewicht in g:	Trockengewicht d. Leber in %	Fettgehalt bzw. Naßgewicht der Leber in % nach Soxhlet	nach Sperry	Fettgehalt d. Leber Trockengewicht in % nach Folch
Gruppe 4	1.570	29.63	30.22	5.21	6.20	20.71
	± 0.137	± 5.10	± 1.70	± 1.33	± 1.69	± 5.36
Gruppe 5	1.592	28.72	31.87	6.82	7.48	25.03
	± 0.231	± 4.60	± 1.72	± 1.52	± 1.58	± 3.62
Gruppe 6	1.764	35.67	36.58	14.10	13.80	41.61
	± 0.200	± 8.46	± 4.42	± 5.83	± 6.21	± 11.28

Plasmakonzentration (ln), durchschnittliche Eliminationskonstante k, und das Bestimmtheitsmaß R^2 bei 3 beziehungsweise 4 gewählten Zeitwerten

Tabelle 5 (Leber ohne Verfettung)

	3 Zeitabschnitte (13 - 23 - 30)	R^2	4 Zeitabschnitte (3 - 13 - 23 - 30)	R^2
Gruppe 1	2.61 - 0.053	0.99	2.90 - 0.069	0.94
16 Wochen	±0.014 ±0.008		±0.16 ±0.011	
Gruppe 2	1.93 - 0.051	0.99	2.67 - 0.082	0.93
(Leber ohne Befund)	±0.11 ±0.04		±0.31 ±0.015	
Gruppe 3	2.09 - 0.053	0.99	2.66 - 0.070	0.95
(Leberschäden)	±0.10 ±0.004		±0.24 ±0.010	

Plasmakonzentration (ln), durchschnittliche Eliminationskonstante k, und das Bestimmtheitsmaß R^2 bei 3 beziehungsweise 4 gewählten Zeitwerten

Tabelle 6 (Leber mit Verfettung)

	3 Zeitabschnitte (13 - 23 - 30)	R^2	4 Zeitabschnitte (3 - 13 - 23 - 30)	R^2
Gruppe 4	2.08 - 0.042	0.99	2.74 - 0.069	0.92
(geringgradiger Fettgehalt)	±0.044 ±0.001		±0.27 ±0.013	
Gruppe 5	2.16 - 0.030	0.99	2.74 - 0.054	0.90
(mittelgradiger Fettgehalt)	±0.05 ±0.002		±0.24 ±0.012	
Gruppe 6	2.49 - 0.041	0.99	3.04 - 0.064	0.90
(hochgradiger Fettgehalt)	±0.06 ±0.002		±0.23 ±0.011	

Diskussion der Ergebnisse

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse zeigen, daß der Bromthaleintest als Mikromethode beim Huhn, und zwar auch wiederholt anwendbar ist. Unverträglichkeiten in Form von schockähnlichen Zuständen traten bei 2,1 % der untersuchten Hennen mit unterschiedlichen Erholungsphasen auf. Ein Tier starb 7 Minuten nach Injektion des Farbstoffes.

Die gesamte Farbstoffausscheidung erfolgt beim Huhn schneller als beim Säuger und beträgt 1 % pro Minute (STURKIE, 1965). Der "Knick" in der Gesamtclearance-Verlaufskurve, welcher bei allen sechs Gruppen auftritt, zeigt, daß die BSP-Elimination in zwei Phasen abläuft. Der Phasenwechsel ist zwischen der 8. und der 13. Minute abgeschlossen. Ersichtlich wird dies auch aus der linearisierten Geraden ab der 8. beziehungsweise der 13. Minute. Während der ersten, schnelleren Eliminationsphase innerhalb der ersten drei Minuten wird das Plasma um 50 % und mehr von dem injizierten Farbstoff befreit. Bei den Gruppen 2 und 3 sind bis zur 13. Minute bereits + 90 % ausgeschieden. Der schnellere Phasenwechsel ist beim Huhn durch die wesentlich kürzere Zirkulationszeit bedingt. Bei der beinahe sturzartigen BSP-Elimination während der ersten Phase ist es schwierig, verläßliche Werte zu erhalten. Zudem erschwert ein eventuell übersättigtes Blutplasma BSP-Exkretionsstudien in der ersten Ausscheidungsphase. In der zweiten Eliminationsphase dagegen, in der Zeit des einsetzenden langsameren BSP-Konzentrationsabfalles, ist eine eindeutige Interpretation des Leberfunktionszustandes möglich.

Trotz einer großen Stichprobenstreuung stehen bei Legehennen die Gesamtclearance k, die fractionale Clearance k, die Gesamtclearanceverlaufskurven, die unterschiedlichen Retentionswerte in einer guten Korrelation zu den histologisch beziehungsweise dem chemisch-analytisch festgestellten Verfettungsgrad der Leber. Geringgradige Leberveränderungen, die das klinische Befinden der Tiere nicht beeinflussen (Gruppe 3), bewirken keine Veränderung der Exkretionsfunktion, die der der verfetteten Leber entspricht. Geringgradige Leberverfettung nach KALK (1965) (Gruppe 4) führt zwar zu anderen Werten wie bei den Tieren mit völlig unveränderten Lebern (Gruppe 2) oder geringgradig veränderter, aber nicht verfetteter Lebern (Gruppe 3). Es überschneiden sich die Schwankungsbereiche innerhalb der 3 Gruppen so stark, daß unzweifelhafte Diagnosen erst bei der mittelgradigen Verfettung (Gruppe 5). beginnen. Das entspricht einem Fettgehalt von 25 bis 35 % bezogen auf das Trockengewicht beziehungsweise 7 % bezogen auf das Naßgewicht der Leber. Gruppe 6 mit einem Fettgehalt von 41,6 % $\pm$ 11,2 verändert die Retentionswerte nicht mehr signifikant gegenüber Gruppe 5. Hier fällt nur der andersartige Verlauf der Gesamtclearancekurve auf, die sich sehr stark dem Bild der Junghennen nähert.

Da nach COUCH (1968) (zitiert nach SPLITTGERBER et al., 1969), nach BULL (1968) und REED et al. (1968) von einem Fettlebersyndrom bei der Legehenne erst ab einem Fettanteil von 35 % gesprochen werden kann, eignet sich dieser Test nicht nur zur Erkennung einer Fettleber, sondern auch zur Diagnose des Fettlebersyndroms bei der Legehenne. Mit Hilfe der Fettleberdiagnose bei der lebenden Henne kann der Verlauf beziehungsweise die Beeinflussung einer damit im Zusammenhang stehenden Leberexkretionsfunktion verfolgt werden.

Trotz der einheitlichen Dosierung von 20 mg Bromthalein pro kg Körpergewicht schwanken die Ergebnisse der Extinktionsmessungen bei den untersuchten Tieren deutlich. Eine der Ursachen kann nach NEWELL und SCHAFFNER (1950) und nach MEDWAY und KARE (1957) darin gesehen werden, daß bei einem höheren Körpergewicht die anfänglich parallel verlaufende Gerade des Blutvolumens die Form einer Regressionskurve annimmt, so daß das Verhältnis zwischen dem Körpergewicht und dem Blutvolumen nicht der berechneten Farbstoffmenge entspricht. CAMPBELL(1957 b) nimmt an, daß eine kompetitive Wirkung zwischen Östrogenen und dem BSP-Transport in der Leber als Ursache der unterschiedlichen Eliminationszeiten innerhalb einer Tiergruppe in Betracht kommt. Ihm gelang es auch, im Experiment durch Östrogengaben bei der Legehenne eine Verzögerung der BSP-Exkretion zu provozieren.

Jedoch haben die juvenilen Hühner der Gruppe 1 mit einem inaktivem Ovar und einer gesunden Leber, bei denen der Östrogenspiegel mit Sicherheit niedriger ist als bei adulten Legehennen eine ähnliche Gesamtclearance-verlaufskurve wie Hühner mit hochgradig verfetteten Lebern (Gruppe 6).

Sucht man die individuellen Schwankungen der Extinktionswerte in den Streuungen des Fettgehaltes der Leber oder etwa in den histologisch nachgewiesenen Leberveränderungen innerhalb einer Tiergruppe, dann widerspricht dem vor allem das Ergebnis der Gruppe 2 (Legehennen mit unveränderten Lebern). Hier schwankt der Fettgehalt, verglichen zu den anderen Tiergruppen, mit 17,24 % $\pm$ 2,65 i.d. Trockensubstanz und 5 ,04 % $\pm$ 0,84/4,73 % $\pm$ 1,19 bezogen auf das Naßgewicht am geringsten. Trotzdem sind die Standardabweichungen der Extinktionswerte bei diesen histologisch gesunden Lebern ebenfalls erheblich. Inwieweit eine BSP-Konjugation an Glutathion beim

Huhn eine Rolle spielt und inwiefern ein Mangel oder ein Überschuß dieses Tripeptides oder der S-arylglutathion-Transferase in der Biotransformation als Ursache der individuellen Schwankungen angesehen werden muß, bedarf beim Huhn einer weiteren Klärung. Beim Säuger wird nach COMBES (1964) der überwiegende Teil des injizierten Farbstoffes an Glutathion gekoppelt. PRIESTLY und PLAA (1969/70) konnten nachweisen, daß durch Ausschalten der Transferase mit einem wirkungsvollen Inhibitor wie Benziodarone oder durch Entleerung des Glutathionanteiles der Leber mit Iodomethan eine verzögerte BSP-Elimination chemisch provoziert werden kann.

Ähnliche Ergebnisse wie COMBES (1964) ermittelten BRAUER et al. (1963) beim Kükenembryo. Beim adulten Huhn soll im Gegensatz zum Küken der Farbstoff Bromthalein überwiegend nativ, ungekoppelt die Leber passieren, was eine schnellere Eliminationszeit bei den Gruppen 2 bis 5 erklären würde, nicht aber die fast parallel verlaufenden Exkretionskurven der Gruppen 1 und 6. Inwieweit eine extrahepatische BSP-Ausscheidung beim Geflügel eine Rolle spielt, ist ebenfalls noch nicht geklärt.

Auch wenn nach POPPER (1961) eine Leberverfettung als solche, trotz ihres dramatischen morphologischen Bildes die Leberfunktion nur wenig stört, muß bei den vorliegenden Untersuchungsergebnissen der verschiedene Verfettungsgrad der Leber bei klinisch gesunden Legehennen als Ursache der unterschiedlichen BSP-Retentionsergebnisse interpretiert werden. Es wurde aber die Grenze der Methode gegenüber Leberfunktionsstörungen anderer Ätiologie nicht berücksichtigt, da es darauf ankam, eine Methode zur Bestimmung einer Fettleber bei einem sonst gesunden Tier zu erstellen.

ZUSAMMENFASSUNG

160 klinisch gesunde Hennen wurden aufgrund eines histologisch und chemisch-analytisch ermittelten Verfettungsgrades der Leber in sechs Gruppen eingeteilt.

Der Bromthaleintest als Mikromethode (20 mg/kg KGW) ist beim Huhn unschwer durchzuführen. Die Ausscheidung verläuft biphasisch. Nur die 2. Phase wird zur Diagnose herangezogen. Die direkte Bestimmungsmethode ist vorzuziehen. Nebenwirkungen wurden bei 2,1 % der Tiere festgestellt. Die Resultate des Leberfunktionstests wurden den einzelnen Gruppen zugeordnet. Die völlig abweichenden Ergebnisse des Tests bei juvenilen Tieren erlauben keinen Vergleich mit legenden Hühnern. Eindeutig diagnostizierbar ist wegen der großen Standardabweichungen der Extinktionsmessungen erst eine mittelgradige Leberverfettung mit mehr als 25 % Gesamtfett bezogen auf das Trockengewicht beziehungsweise mit mehr als 7 % Gesamtfett bezogen auf das Naßgewicht der Leber. Die BSP-Plasmaretention ist bei diesen Tieren bei 30 Minuten höher als 8 %, was einen Farbstoffanteil im Plasma von mehr als 3 mg % entspricht. Liegen die Fettwerte höher als 35 % in der Trockensubstanz und über 12 % (Naßgewicht), dann ändern sich die Werte der Leberfunktionsprobe quantitativ nur mehr geringgradig.

Die Methode eignet sich zur Diagnose einer Leberverfettung bei einer sonst gesunden Henne und bietet Möglichkeit für eine exakte Beurteilung von therapeutischen Versuchen zur Beeinflussung eines Fettlebersyndroms.

SUMMARY

160 clinically healthy chickens were divided into 6 groups based on the histological and analytical fat content of the liver.

The liver function test with BSP (Bromthalein, 20 mg/kg body weight) as a micromethod can be easily performed on the chicken. The dye excretion-curve is biphasic. Only the second phase is being used for diagnosis. The direct measuring method is preferred. Side effects were noticed on 2,1% of the examined birds. The results of the liver function test were assigned to the different groups. The entirely different test-results of the juvenile birds allow no comparison with laying hens. A clear discernible fatty liver is due to the great standard deviation of the dye extinction values only diagnostable from a medium fatty metamorphosis of the liver, i.e. with more than 25% of total fat in dry matter and more than 7% of total fat of wet weight of the liver. The BSP-plasma retention is greater than 8% at 30 minutes and the plasma content of the dye is higher than 3 mg%. The results of the BSP-liver function test are changing only to a minor degree, when the fat value of the liver is higher than 35% in dry matter an 12% of the wet weight.

This method is suitable to diagnose a fatty liver of an otherwise healthy hen and is offers a possibility for an exact evaluation of therapeutical experiments in order to influence the fatty liver syndrome.

LITERATURVERZEICHNIS

AKTAN, F. (1954): Die Leberfunktionsprüfung mit Bromthalein beim Pferde. Monatshefte f. Vet.-Medizin 9:97

APPEL, M. (1956): Vergleichende Untersuchungen mit verschiedenen Leberfunktionsprüfungen beim Pferd. Vet. Med. Diss. Hannover

BARTON, TH. (1967): Fatty liver studies in laying hens Ph. D. Thesis, Michigan State University, Dept. of Poultry Science

BARTON, TH., L. FLEGAL u. P.J. SCHAIBLE (1966): "Fatty liver" syndrome in laying hens as influenced by protein energy ration Poultry Science 45: 1068

BEYREDER, J. u. H. RETTENBACHER-DÄUBNER (1956): Zur Methodik und klinischen Auswertung des Bromthaleintestes Wien. Med. Wschr. 34: 722

BIERER, B.W., T.H. ELEAZER u. D.E. ROEBUCK (1964): Sedimentation rate, packed cell volume, buffy coat value and rectal temperature of chickens and turkeys at various ages J.A. V.M.A. 144: 727

BÖHLE, E., W. ERB u. W. SIEDE (1968): Alkohol und Fettleber Der Internist 9: 247

BRAUER, R. W., L.M. JULIAN u. J.S. KREBS (1963): Maturation of liver function in the chick embryo as explored with S^{35}-Sulfobromophthalein - Vascular factors, biliary secretion, and conjugation
Ann. N.Y. Acad. Sc. 111: 136

BULL, H.S. (1968): Fatty liver syndrome in laying hens
Proc. of the 23rd Ann. Texas Nutr. Conf.
p. 219

CAMPBELL, J.G. (1957): Studies of the influence of sex hormones on the avian liver

a) I. Sexual differences in avian liver clearance curves
J. Endocrin 15 : 339

b) II. Acute liver damage in the male fowl, and the protective effect of oestrogen, as determined by a liver function test
J. Endocrin 15 : 346

c) III. Oestrogen-Induced regeneration of the chronically damaged liver
J. Endocrin 15 : 351

CLARKSON, M.J. (1961): Bromsulphthalein liver clearance in the bird.
1. The relationship between plasma levels and bile and liver content in the turkey
Vet. Sc. 2 : 143

CLAUSEN, H. (1954): Zur Methodik der Clearancezeit
Z. f. d. Inn. Med. 9 : 250

CLAUSEN, H. (1954): Über die Clearancezeit (Halbwertzeit nach Dost.)
Z. f. d. Inn. Med. 9 : 305

COLES, E. H. (1969): Veterinary Clinical Pathology
W. B. Saunders Company

COMBES, B. (1964): Excretory function of the liver
In: The Liver-Morphology, Biochemistry, Physiology, ed. by C. H. Roullier, vol II: 1-35 Academic Press

CORNELIUS, C. E. u. J.D. WHEAT (1957): Bromsulphalein clearance in the horse - a quantitative liver function test
Am. J. Vet. Res. 18 : 369

COUCH, J. R. (1956): Fatty livers in laying hens - a condition which may occur as a result of increased strain.
Feedstuffs 28 (47) : 46

DARCEL, C. le Q. u. R.W. BIDE (1970): Avian Erythroblastosis: Plasma clearance studies
Avian Disease XIV: 521

DOST, F.H. (1954): Halbwertzeit und totale Clearance
Z. f.d. Inn. Med. 9: 546

DOST, F.H. (1958): Die Entwicklung des Clearanceverfahrens zu einer Funktionsprobe von allgemeiner klinischer Bedeutung
Z. f. d. Inn. Med. 13 : 245

FARR, F. M. u. J. R. COUCH (1968): The determination of fat liver Proc. of the 23rd Ann. Texas Nutr. Conf. 171

FIGUEROA, T. V. (1969): Effects of Methionine, Thiouracil, Dienoestrol Diacetate and Thyroprotein on the development and prevention of fatty liver in laying hens
Tecnica Pecuaria Suppl. No. 1 : 78

FOLCH, J., M. LEES u. G.H. STANLEY (1957): A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissue
J. Biol. Chem. 226: 497

FREESE, U. (1952): Die Leberfunktionsprobe mit Bromsulphalein beim Rind
Vet. Diss. Hannover

GREMMEL, W. (1951): Die Verwendung des Bromsulphaleins zur Prüfung der Leberfunktion beim Hund
Vet. Diss. Hannover

GREUEL, E. HARTFIEL W. (1969): Fettlebersyndrom bei Legehühnern
Kraftfutter, 52: 167

GREUEL, E. u. W. HARTFIEL (1968): Veränderungen im Fettgehalt und Fettsäuremuster bei Hennen mit Fettleber - Syndrom
Deutsch. Tierärztl. Wschr. 75: 294

HARTFIEL, W. (1970): Beitrag zum Fettlebersyndrom der Legehenne
XIV. Congreso Mundial de Avicultura
Madrid 1970: 670, Secciones I - II

HARTFIEL, W., E. GREUEL u. R. M. WEGENER (1970): Untersuchungen zum Fettlebersyndrom. Vergleich von Boden- und Käfighaltung
Archiv f. Geflügelkunde 34: 140

HARTFIEL, W., E. GREUEL u. H. GRASSMANN (1970): Weitere Ergebnisse zum Fettlebersyndrom bei Legehennen
Archiv f. Geflügelkunde 34: 190

HEELSBERGEN van, N. (1929): Handbuch d. Geflügelkrankheiten und der Geflügelzucht
Verlag Ferdinand Enke, Stuttgart

HERKEN, H. u. K. STAPENHORST (1955): Die Bromsulphalein-Probe
Ihre Vorzüge und ihre Begrenzung
Deutsch. Archiv f. klin. Med. 202: 52

HOFMANN, H. TH. u. H. OETTEL (1954): Die Leberfunktionsprüfung mit dem Bromsulphthaleintest als einfache Mikromethode
Ärztl. Wschr. 9: 965

IRSIGLER, K. u. I. HRABAL (1968): Zur Neutralfettbestimmung im Biopsiematerial der menschlichen Leber Methodik und quantitative Untersuchungen
Klin. Wschr. 46: 432

JULIAN, L.M., J. S. KREBS u. R.W. BRAUER (1955): Liver functions in chick embryo - studies involving S^{35} BSP and P^{32} $CrPO_4$ colloid
Fed. Proc. 14: 355

KAFFARNIK, H., W. GROSS u. R. JUCHEMS (1967): Über die Treffsicherheit von Laboruntersuchungen in der Diagnostik der Fettleber
MMW 109: 199

KALK, H. (1965): Über die Fettleber
MMW 107: 1141

KESSEL, M., P. KÖRTGE u. F.A. PEZOLD (1954): Tierexperimentelle Leberfunktionsstudien II. Mitteilung: Verhalten der Bromsulphthaleinausscheidung beim Kaninchen unter chronischer Allylformiatvergiftung
Archiv exper. Path. u. Pharmakol. 223: 127

KESSEL, M. u. F.A. PEZOLD (1957): Der Bromsulphaleintest (Ausführung, Brauchbarkeit, Begrenzung)
Ärztl. Wschr. 12: 956

KONITZER, K. (1958): Zur Funktionsprüfung der Leber mit Bromsulphalein
Z. f. d. Inn. Med. 13: 981

KREBS, J. u. R. W. BRAUER (1949): Uptake of Bromsulphthalein by the liver of the rat. II. Studies with radioactive Bromsulphthalein (BSP)
Fed. Proc. 8: 310

KREMER, G.J., F.K. KÖSSLING, H.J. LANGE u. N. VICTOR (1969): Bestimmung des Fettgehalts in der Leber. Chem. und histolog. Untersuchungen an 150 Leberpunktaten
Deutsch. Med. Wschr. 94: 163

LETTOW, E. (1960): Experimentelle und klinische Untersuchungen zur Diagnostik der Lebererkrankungen des Hundes
Zbl. f. Vet. IX: 75 und 109

LÖLIGER, H. CH. u. H. J. SCHUBERT (1967): Der Hämatokritwert von gesunden und kranken Hühnern verschiedener Altersgruppen und sein diagnostischer Anwendungsbereich
Berl. u. Münchn. Tierärztl. Wschr. 80: 171

LOMBARDI, B. (1965): Pathogenesis of fatty liver
Fed. Proc. 24: 1200

Mc MANUS, J.F. u. R.W. MOWRY (1964): Staining methods (Histologic and histochemical)
Hoeber International Reprint

MEDWAY, W. u. M.R. KARE (1959): Blood and plasma volume, hematocrit, blood specific gravity and serum protein electrophoresis of the chicken
Poultry Science 38: 624

MERCK (1966): Bromthalein (Phenoltetrabromphthaleinsäure Dinatriumsalz) - zur Funktionsprüfung der Leber
Merck, Darmstadt

MIELKE, H. (1959): Der BSP-Leberfunktionstest beim Hund
I. Mitteilung: Die direkte Bestimmung der Farbstoffretention
Arch. f. Exp. Vet. 24: 359

MIELKE, H. (1959): Der BSP-Leberfunktionstest beim Hund
II. Mitteilung: Die Bestimmung der indirekten Eliminationsgrößen
Arch. f. Exp. Vet. 24: 380

MIXNER, J. P. u. W. G. ROBERTSON (1957): Bromsulphalein fractional clearance in dairy cattle as a criterion of liver function, and the simultaneous determination of volumes of plasma and blood
J. Dairy Science XL: 914

NEWELL, G.W. u. C.S. SCHAFFNER (1950): Blood volume determinations in chickens
Poultry Science 29 : 78

OPPENHEIM, M., A. ESSLLIER u. H. ROSENMUND (1951/21): Kombinierte Leberfunktionsprüfungen mit besonderer Berücksichtigung der Bromsulphaleinprobe
Gastroenterologia 77/78: 28

PEZOLD, F.A. u. M. KESSEL (1957): Der Bromsulphaleintest in der Leberdiagnostik: Untersuchungen zur Methodik, Bewertung und klinische Brauchbarkeit
Deutsch. Arch. f. klin. Med. 204: 518

PFEIFFER, A. (1970): Der Bromthaleintest zur klin. Leberfunktionsprüfung beim Schwein
Zbl. f. Vet. Med. Reihe A: 157

POPPER, H. (1961): Morphologic and biochemical aspects of fatty liver
Acta Hepato-Splenologica 8: 279

POPPER, H. u. F. SCHAFFNER (1961): Klinische Untersuchungen zur Funktion und Struktur der Leber
Georg Thieme Verlag Stuttgart

PRIESTLY, B. G. u. G.L. PLAA (1969): Effects of Benziadarone on the metabolism and biliary excretion of Sulfobromophthalein and related dyes
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 132: 881

PRIESTLY, B. G. u. G.L. PLAA (1970): Sulfobromophthalein metabolism and excretion in rats with Iodomethane - induced depletion of hepatic Glutathione
J. Of Pharm. and Exp. Therapeutics
174: 221

REED J. R., DEACON L.E., FARR F., COUCH J.R. (1968): Inositol and fatty liver syndrome
Proc. of the 23. Ann. Texas Nutr. Conf.
p. 204

REINHARDT, R. (1950): Lehrbuch der Geflügelkrankheiten
Verlag M. & H. Schaper, Hannover

ROMMEL, K. u. M. TÖRÖK (1967): Diagnostik der Fettleber
Med. Welt 46: 2746

ROSENTHAL, S. M. u. E. C. WHITE (1925): Clinical apllication of the Bromsulphalein test for hepatic function
J. A. M. A. 11: 1112

ROSSOW, N. u. H. MIELKE (1962): Zur Leberphysiologie des Schafes
II. Die Bestimmung indirekter BSP-Eliminationsgrößen (Eliminationskonstante, Halbwertszeit, Totalclearance)
Arch. Exp. Vet. 16: 705

RUBARTH, S. (1967): Leber und Gallenwege, in Ernst Joest Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere
3. Auflage, VI II. Teil
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg

SALLMANN, H. P. u. J. SCHOLE (1971): Untersuchungen zum Fettleberproblem des Legehenne
Z. f. Tierphysiologie, Tierernährung und Futtermittelkunde 27: 210

SCHÄFER, H. (1951): Leberfunktionsprüfungen
Wiss. Verlagsges. Stuttgart

SCHMITT, W. (1968): Verhalten der Leberfunktionsproben und Fermente bei verschiedenen Stadien der Leberverfettung unter Tolbutamid-Langzeitbehandlung
Med. Welt: 1060

SCHULZ, J. A., N. ROSSOW u. D. URBANECK (1960): Ein Beitrag zur Diagnose der Lebererkrankungen des Rindes durch Clearance-Untersuchungen mit Bromsulphalein und gleichzeitig vorgenommene Leberbiopsie
Monatshefte f. Vet. 15: 257

SIEGMUND, H. (1952): Allgemeine Pathologie der Leberparenchymveränderungen unter besonderer Berücksichtigung zirkulatorischer und nutritiver Faktoren
Deutsch. Z. Verdauungs- und Stoffwechselkr. Sonderb. 1952: 31

SOLBERG, J. (1971): Effects on layers of different levels of protein herring meal, methionine, and lysine in their diets
Arch. f. Geflügelkunde 35: 164

SOVA, Z. u. J. KOMAREK (1964): Der Bromsulphalein-Leberfunktionstest beim Pferd I. Mitteilung: Die direkte Bestimmung der Farbstoffretention
Zbl. Vet. Med. 11: 448

SOVA, Z., MIKOVAU , Z. NEMEC (1968): Leberchromoexkretionen bei gesunden Rhodeländer-Hennen
Deutsch. Tierärztl. Wschr. 75: 381

SPERRY, W. M. (1955): Lipide Analysis, Methods of biochem. Analysis II: 83

SPIES, R. u. W. TRAUER (1956): Kritisches zum Bromsulphaleintest
Wien, klin. Wschr.: 174

SPLITTGERBER, H., F. K. WEIN u. R. ARHELGER (1969): Untersuchungen über die Höhe des Fettgehalts der Leber von Hennen bei verschiedenen Futtermischungen
Deutsch. Geflügelwirtschaft 24: 1021

SPLITTGERBER, H., F.K. WEIN u. R. ARHELGER (1970): Untersuchungen zur Fettleber bei Legehennen
Deutsch. Geflügelwirtschaft 18: 646

SPÖRRI, H. (1969): Pathophysiologie der Haustiere
Paul Parey Verlag

STURKIE, P. D. (1965): Avian Physiology II. Edition
Cornell University Press, Ithaca

STURKIE, P. D.u. K. TEXTOR (1965): Sedimentation rate of erythrocytes in chickens as influenced by method and sex.
Poultry Science 37 : 1

THALER, H. (1966): Die Diagnose der Fettleber
Deutsch. Med. Wschr. 91: 2171

UHLMANN, W. (1954): Definition und theoretische Grundlagen zur experimentellen Bestimmung einer hepatischen Clearance
Z. f. d. ges. inn. Med. 9 : 598

URBANECK, D. u. H. SEIDEL (1969): In Lehrbuch der pathologischen Physiologie der Haustiere
Gustav Fischer Verlag

VOGT, D. u. K. STEHR (1956): Eine Mikromethode zur Leberfunktionsprüfung mit Bromsulphthalein
Med. Mschr. 10 : 154

WEBER, E. (1967): Grundriß der biologischen Statistik
Gustav Fischer Verlag Stuttgart

WITTE, D. M. (1970): Untersuchungen zur Methodik der Bromsulphaleinprobe beim Rind
Vet. Diss. Hannover

WRIGHT, K. N. (1969): Fatty liver syndrome in commercial layers
North Carolina University 1969

Frau Professor Dr. I. Gylstorff bin ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit zu Dank verpflichtet.

Allen Institutsangehörigen möchte ich für die stetige Hilfsbereitschaft und für das stets entgegengebrachte Verständnis danken.

LEBENSLAUF

Am 20. Oktober 1939 wurde ich, Peter K. Hocke, als Sohn des Dolmetschers Martin Hocke und seiner Ehefrau Elisabeth Hocke, geb. Vetter, in Rom/Italien geboren.

Nach der Flucht meiner Eltern und meiner drei Geschwister aus Italien besuchte ich in Aach-Linz Krs. Überlingen, in Engelburg/Schweiz und in Sentenhart Krs. Stockach die Volksschule bis zur vierten Klasse. Von 1950 bis 1953 besuchte ich das Salvatorkolleg in Bad Wurzach. Anschließend war ich Schüler am Realgymnasium in Radolfzell bis 1955. 1956 bis 1961 war ich Arbeiter im Westen Kanadas. 1962 bis 1963 besuchte ich die Privatschule Maturum in Frankfurt und bestand im Frühjahr das Abitur für Nichtschüler am Gymnasium Philippinum in Weilburg/Lahn.

1963 begann ich mit dem Studium der Tiermedizin in München, studierte 1965 das erste klinische Semester in Zürich und bestand im Frühjahr 1968 das Staatsexamen in München.

Ab Herbst 1968 bis Sommer 1969 war ich als Instructor im Department of Veterinary Pathology am Western College of Veterinary Medicine der Universität von Saskatchewan, in Sakatoon/Kanada angestellt. Seit August 1969 bin ich als Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle am Institut für Krankheiten des Haus- und Wildgeflügels an der Universität München tätig.